

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FERMENTATION LACTIQUE

PAR M. E. KAYSER.

Depuis le mémoire classique de M. Pasteur, l'attention des savants s'est souvent portée sur la fermentation lactique, et à la notion d'un ferment unique, présidant au dédoublement d'une molécule de sucre en deux molécules d'acide lactique, s'est peu à peu substituée la conception d'êtres très nombreux, jouissant tous plus ou moins de la propriété de produire de l'acide lactique aux dépens des sucres, mais différant par leurs formes, leurs conditions d'existence, la proportion et la nature de l'acide lactique formé. On trouvera l'histoire de quelques-uns de ces êtres divers dans les mémoires de MM. *Boutroux*, *Pirotta* et *Riboni*, *Grotensfelt*, *Hueppe*, *Hayduck*, *Lindner*, *Marpmann*, *Beyerinck*, *Krueger*, *Schardinger*, *Tate*, *Escherich*, *Bischler*, *Nencki*, *Percy-Frankland*, *Lister*, *V. Storck*, *Weigmann*, de *Freudenreich*, et cette liste est loin d'être épuisée.

Il m'a paru que, à côté de ces histoires particulières, il y avait utilité à essayer un travail d'ensemble, dans lequel on étudierait simultanément et par les mêmes méthodes des ferments d'origines diverses, de façon à voir si les différences qu'on avait relevées jusqu'ici étaient foncières ou si elles tenaient à des conditions de culture et d'éducation. Avant d'assigner à tel ou tel ferment des propriétés permettant de le caractériser, il faut d'abord s'assurer si ces propriétés sont contingentes ou stables. C'est ce que j'ai essayé de voir pour divers ferments lactiques.

Ceux que j'ai étudiés d'une façon spéciale sont au nombre de 15; je les ai désignés par les lettres de l'alphabet; les fer-

ments *d, e, f, g* m'ont été gracieusement fournis par MM. Nencki et de Freudenreich; le ferment *s* est celui de la mammite contagieuse des vaches, je le dois à l'obligeance de M. Nocard ¹.

Tous les autres ont été purifiés par les méthodes ordinaires de microbiologie.

J'ai comparé d'abord ces ferments dans divers milieux solides et liquides; pour les milieux solides, j'ai adopté une échelle empirique de 1 à 10 pour caractériser l'épaisseur et l'aspect de la colonie; voici les observations faites à cet égard.

Ferment a. — Origine : Crème de Normandie; forme, sur l'eau de touraillons gélatinisée, une strie mince représentée par le nombre 3, sur gélose nutritive un tracé faible avec stries écailleuses représenté par 2; donne avec le lait un caillé très ferme, très dense; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 20 à 24 heures; se présente dans le jus d'oignons en chaînes de 4, 6 et 8 articles.

Ferment b. — Origine : Crème de la Vendée; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie bien continue, représentée par 6; sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne avec le lait un caillé très ferme; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 24 heures; se présente dans le jus d'oignons sous la forme de chaînes plus longues que *a*, et montrant jusqu'à 12 articles.

Ferment c. — Origine : Crème de Larzac; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 3; sur gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne avec le lait un caillé très ferme; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 24 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes de 3 à 4 articles, plus petits que ceux des ferments *a* et *b*.

Ferment d. — *Bac. Guillebeau, c*, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée de bougie en saillie, représentée par 9; sur gélose nutritive un voile épais crémeux représenté par 10; donne un caillé granuleux avec beaucoup de sérum; fait cailler le lait à 28° dans les 36 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 2 à 4 articles, plus gros que ceux des ferments *a, b, c*.

Ferment e. — *Bac. Bischleri*, forme sur l'eau de touraillons

1. Voir sa description dans le t. I de ces *Annales*, p. 109.

gélatinisée une strie bien continue représentée par 6; donne sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne un caillé granuleux avec rétraction nette; caille le lait à 28° au bout de 84 à 90 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 4 à 6 articles qui ont environ 4 μ de long sur 3 μ de large.

Ferment f. — *Bac. aerogenes*, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée de bougie en saillie représentée par 9; donne sur gélose nutritive un voile épais crémeux représenté par 10; donne un caillé granuleux avec rétraction nette; fait cailler le lait à 28° dans les 36 heures; dans le jus d'oignons, il montre des chaînes nombreuses et longues de 10 à 12 articles, un peu plus petits que ceux du ferment *d*.

Ferment g. — *B. de Freudenreich a*, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie rugueuse représentée par 5; sur la gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne un caillé un peu contracté; fait cailler le lait à 28° dans les 72 à 84 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes très longues de 15 à 18 articles.

Ferment h. — Origine : Infusion de seigle; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée, une strie rugueuse représentée par 5; sur gélose nutritive un tracé excessivement mince représenté par 1; donne un caillé très rétracté; fait cailler le lait à la température de 28° dans les 100 à 120 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 4 à 5 articles, de la grosseur des ferments *a*, *b*, *c*.

Ferment l. — Origine : Moût de distillerie; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie continue représentée par 4; sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne un caillé très serré; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 2 articles.

Ferment m. — Origine : Moût de distillerie; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 4; sur gélose nutritive un tracé lisse, très mince, représenté par 1,5; donne un caillé très serré; fait cailler le lait à 28° dans les 48 à 60 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes très longues, recourbées, de 12 à 15 articles.

Ferment n. — Origine : Jus de choucroute; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée très épaisse avec pénétration nette représentée par 10; sur gélose nutritive un voile

large, étendu, représenté par 8; donne un caillé avec légère rétraction; caille le lait à 28° dans les 60 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes très longues de 20 articles et plus.

Ferment o. — Origine : Bière belge; présente sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 3, sur gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne un caillé ferme, caille le lait à 28° dans les 72 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes avec 20 articles.

Ferment p. — Origine : Bière belge; présente sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie rugueuse représentée par 5,5; sur gélose nutritive un tracé faible avec stries écailleuses représenté par 2; donne un caillé très ferme; caille le lait à 28° dans les 72 à 84 heures, montre dans le jus d'oignons des chaînes de 15 à 20 articles.

Ferment r. — Origine : Crème de Copenhague; donne un caillé ferme; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; présente des chaînes de 6 à 8 articles; dans les milieux liquides, ressemble au ferment *b*.

Ferment s. — B. de la mammite contagieuse des vaches, donne un caillé ferme; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; se présente dans les milieux liquides sous la forme de coccus isolés, deux par deux ou en chaînettes.

ACTION DE LA CHALEUR

Tous ces ferments ont des propriétés très différentes, ainsi qu'on peut s'en assurer par divers moyens; étudions, par exemple, leur résistance au chauffage en milieu acide.

Dans ce but je me suis servi de pipettes d'ensemencement, très étroites et très effilées à leur partie inférieure, de façon à s'allonger en un petit tube d'environ 2 millimètres de diamètre. Ces tubes, fermés par un tampon de coton et stérilisés au four à flamber, recevaient quelques gouttes d'une fermentation lactique pure et obtenue en l'absence de carbonate de chaux, c'est-à-dire acide. Les cultures qui ont servi à l'expérience avaient de 4 à 5 jours; je n'ai pas titré l'acidité, mais on ne s'écarte pas trop de la vérité, en la considérant comme sensiblement la même pour tous les ferments.

Les pipettes subissaient un chauffage de 5', 10', 15' au bain-marie ; sitôt le nombre de minutes écoulé, on les plongeait dans l'eau froide, et on ensemencait 10 c. c. de lait stérile ; il n'y avait plus qu'à observer le moment de la coagulation du lait.

Dans le tableau suivant, la lettre D indique qu'il y a eu développement, la lettre M que le lait n'a pas caillé et que le chauffage avait tué le ferment ; dans chaque expérience il y avait des laits témoins ensemencés avec les ferments non chauffés pour constater leur vitalité.

	55°		60°		65°
	10'	15'	5'	10'	3'
<i>a</i>	DD	M	M	M	M
<i>b</i>	DD	M	M	M	M
<i>c</i>	DD	M	M	M	M
<i>d</i>	DD	DD	DD	DD	D
<i>e</i>	DM	M	M	M	M
<i>f</i>	DD	M	M	M	M
<i>g</i>	DD	DD	DD	DD	M
<i>h</i>	DD	M	M	M	M
<i>l</i>	DM	M	M	M	M
<i>m</i>	DD	DD	DD	DD	M
<i>n</i>	DD	DD	DM	M	M
<i>o</i>	DD	DD	DD	M	M
<i>p</i>	DD	DD	DD	M	M
<i>r</i>	DD	M	M	M	M
<i>s</i>	DD	DD	DD	DD	M

On voit que les ferments lactiques ne semblent pas avoir la même faculté de résistance à la chaleur. Les ferments *a*, *b*, *c*, *r*, retirés de la crème, semblent plus fragiles, ne résistent pas même à 5' de chauffage à 60°, tandis que les ferments *g*, *s*, *n*, *m*, *o*, *p* et notamment *d* sont très résistants ; c'est d'ailleurs parmi ces derniers que nous trouvons les ferments qui, toutes choses égales ailleurs, donnent un maximum d'acidité.

Cette résistance dépend et de l'acidité du milieu dans lequel les ferments ont été chauffés et de l'acidité ou de l'alcalinité plus ou moins grande du lait qui a servi à l'expérience.

TEMPÉRATURE OPTIMA

Comparons-les maintenant au point de vue du temps qu'ils mettent à cailler un même volume de lait à différentes températures. La comparaison n'est pas parfaite, car la durée de coagulation dépend non seulement du ferment employé, de sa multiplication, de sa plus ou moins rapide croissance aux différentes températures, mais aussi de ce que la dose d'acide nécessaire pour la coagulation diminue à mesure que la température s'élève. Mais, malgré la superposition de ces effets, la méthode de mesure, qui est dans les conditions de la pratique, suffit pour nous révéler des différences profondes entre les divers ferments.

Hueppe avait fixé pour les limites optima de la fermentation lactique 35 à 42°, Liebig 30 à 35°, et Mayer 30 à 40°; voici celles que j'ai trouvées pour mes ferments :

Le tableau indique, en heures, les temps de coagulation des divers ferments aux températures indiquées sur la première ligne.

	40°	45°	20°	25°	30°	35°	40°	45°
<i>a</i>	»	96 ^{hs}	48 ^{hs}	24 ^{hs}	24 ^{hs}	24 ^{hs}	50 ^{hs}	»
<i>b</i>	»	84	48	36	24	24	30	»
<i>c</i>	»	436	96	60	48	30	30	»
<i>d</i>	»	»	158	72	36	24	12	24
<i>e</i>	»	»	168	132	108	132	»	»
<i>f</i>	»	»	324	60	36	24	12	24
<i>g</i>	»	»	242	96	90	84	»	»
<i>h</i>	»	»	242	168	132	132	»	»
<i>l</i>	»	84	36	36	36	24	20	»
<i>m</i>	»	324	230	84	72	60	30	»
<i>n</i>	»	240	134	72	48	36	36	»
<i>o</i>	»	372	230	84	72	48	48	»
<i>p</i>	»	168	108	96	72	60	70	»
<i>r</i>	»	84	48	36	30	24	30	»

La température du bain-marie a été maintenue constante à l'aide d'un régulateur Etienne.

On voit par là qu'aucun ferment n'a pu cailler le lait, après une durée de 35 jours, à la température de 40°; il y en a qui n'ont pas agi à la température de 45°.

Les essais aux températures de 40° et de 45° ont duré 8 jours; les 3 ferments *e*, *g*, *h*, n'ont pas caillé le lait à 40°, mais les tubes, ramenés à 30°, n'ont pas tardé à se cailler.

A la température de 45°, les 3 ferments *d*, *f*, *l*, seuls ont agi ; les tubes des 3 ferments *m*, *o*, *p* reportés à 30° ont caillé, ces trois ferments n'étaient donc pas morts.

Si nous plaçons les ferments *d* et *f* à part, nous voyons que la température optima peut être comprise entre 30 et 35° pour les divers ferments étudiés.

INFLUENCE DE LA DESSICCATION

Les ferments lactiques, mis en gouttelettes sur des bandes de papier stérile, contenues dans des tubes flambés, conservent leur faculté de cailler le lait pendant longtemps.

J'ai préparé trois lots de tubes : le premier lot a été placé à l'étuve à la température de 25° ; le second lot a été conservé au frais, mais recevait l'action directe de la lumière, le troisième lot également maintenu au frais était dans une obscurité complète.

Après trois mois, j'ai versé du lait stérile dans tous les tubes ; tous ont caillé, ce qui prouvait que tous les ferments étaient encore vivants, et que ni la dessiccation ni la lumière n'avaient en rien modifié leurs premières propriétés.

INFLUENCE DES MILIEUX

L'étude chimique des transformations que les ferments lactiques amènent dans les milieux de culture est facile. Les gaz dégagés sont surtout formés d'acide carbonique, surtout lorsqu'on a ajouté du carbonate de chaux pour maintenir le liquide au voisinage de la neutralité. On a cependant quelquefois trouvé de l'azote, de l'hydrogène, et Baginski a obtenu du CH_4 avec le *B. lactis Escherich*. Je dirai tout de suite que dans une fermentation lactique très active faite en présence de carbonate de chaux et installée pour l'étude des gaz, j'ai trouvé exclusivement de l'acide carbonique. Les petites quantités d'azote qui formait le résidu provenaient évidemment de la petite portion d'azote qui reste obstinément dans un liquide qui a séjourné à l'air, et n'abandonne qu'avec beaucoup de résistance le gaz qu'il a dissous.

Les produits non gazeux sont l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique. On dose les acides volatils par la méthode des distillations fractionnées faites suivant les indications de M. Duclaux. L'acide lactique est séparé par l'éther et pesé à l'état de sel de zinc, de chaux, ou de cadmium. L'acétone, dont il se forme souvent des traces, est appréciée par la combinaison jaune qu'elle forme avec l'hydroxyde de mercure. Enfin l'alcool est dosé au compte-gouttes de M. Duclaux, ou, quand il y en a peu, apprécié par la réaction de l'iodoforme.

Résultats. — Ces méthodes m'ont permis de trouver, comme produits principaux de la fermentation lactique, l'acide lactique et l'acide acétique en proportion variable avec le ferment, la nature du milieu, le mode de culture et diverses autres circonstances que nous examinerons plus loin.

Je n'ai jamais pu constater la présence de l'acide succinique. Il faut signaler des traces d'acide formique, d'acétone et d'alcool éthylique. L'acide formique est en quantités variables, n'arrivant jamais à 1 0/0 de l'acide lactique. L'alcool est en proportions plus grandes, surtout dans les fermentations en présence de craie, et peut atteindre 3 à 4 0/0 du poids de l'acide lactique.

La différence entre l'acidité totale et l'acidité volatile a pu me fournir une idée suffisamment exacte de la quantité d'acide lactique formé; les trois acidités totale, volatile et fixe sont partout exprimées en grammes; il en est de même des autres données analytiques qui en sont susceptibles.

J'ai calculé, pour un grand nombre d'expériences, le rapport qui existe entre l'acidité fixe ainsi obtenue et l'acidité volatile. On le trouvera, dans les tableaux qui suivent, sous le nom de *rapport A*. Nous verrons qu'il est très variable d'un ferment à l'autre.

L'acidité dépend du microbe ensemencé, de la nature du corps fermentescible; de plus, pour une même matière fermentescible, elle est influencée par la durée de la fermentation, l'âge du microbe, le mode d'éducation, le mode de culture, la richesse du milieu en matières azotées et en hydrates de carbone.

Examinons successivement ces diverses influences.

RÉACTION DU MILIEU

Voici, pour trois milieux différents, les chiffres représentant l'acidité totale, l'acidité volatile, l'acidité fixe obtenue par diffé-

rence, ainsi que le rapport entre l'acidité fixe et l'acidité volatile; les résultats obtenus sont représentés par le graphique I¹.

Premier milieu.

Solution de lactose 50/0 et peptone 20/0 — durée 25 jours.

Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
<i>a</i>	3.32	0.165	3.16	19.1
<i>b</i>	3.82	0.355	3.47	9.7
<i>c</i>	3.31	0.178	3.38	18.7
<i>d</i>	1.72	0.131	1.59	12.1
<i>e</i>	5.31	0.620	4.69	7.5
<i>f</i>	1.40	0.785	0.62	0.8
<i>g</i>	6.59	0.293	6.30	21.6
<i>h</i>	4.26	0.301	3.86	12.8
<i>l</i>	5.00	0.368	4.67	12.1
<i>m</i>	5.34	0.523	4.98	9.3
<i>n</i>	5.31	0.308	5.00	16.2
<i>o</i>	6.08	0.254	5.73	22.5
<i>p</i>	5.65	0.381	5.27	13.7

Deuxième milieu.

Lait peptonisé. — Durée de la fermentation : cinq semaines.

Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
<i>a</i>	5.54	0.91	4.63	5.0
<i>b</i>	3.91	1.15	2.76	2.4
<i>c</i>	4.91	1.00	3.91	3.9
<i>d</i>	3.24	2.13	1.11	0.5
<i>e</i>	6.59	1.84	4.75	2.5
<i>f</i>	2.24	2.20	0.04	—
<i>g</i>	15.80	1.75	14.05	8.0
<i>h</i>	6.20	2.13	4.07	1.9
<i>l</i>	5.00	2.33	2.67	1.1
<i>m</i>	10.50	1.87	8.63	4.6
<i>n</i>	12.30	1.93	10.37	5.3
<i>o</i>	14.70	1.94	12.76	6.4
<i>p</i>	17.80	2.34	15.46	6.5

Même lait non peptonisé.

<i>m</i>	7.60	—	—	—
<i>n</i>	8.20	—	—	—

1. Dans tous les graphiques l'acidité représentée se rapporte au litre.

Troisième milieu.

*Solution de maltose 5,6. 0/0, peptone 2 0/0 —
durée cinq semaines.*

Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
<i>b</i>	1.66	0.133	1.55	13.7
<i>d</i>	0.83	0.446	0.38	0.85
<i>e</i>	2.34	0.675	1.67	2.40
<i>g</i>	4.05	0.217	3.83	17.6
<i>h</i>	2.68	0.724	1.96	2.7
<i>m</i>	4.57	0.246	4.32	17.5
<i>n</i>	5.33	0.344	4.99	14.5
<i>o</i>	3.88	0.254	3.63	14.3
<i>p</i>	3.67	0.285	3.39	11.9

La comparaison de ces trois tableaux, ou l'examen du graphique I, nous montre que les acidités totale, volatile et fixe peuvent varier énormément, et non seulement en passant d'un ferment à l'autre dans le même milieu, mais encore pour le même ferment dans différents milieux.

Nous voyons que l'acidité fixe est très élevée dans le lait peptonisé, c'est que dans ce milieu les ferments lactiques trouvent les aliments azotés sous une forme très assimilable; la richesse saccharine est, en effet, approximativement la même dans les divers milieux étudiés; nous constatons d'ailleurs une grande différence entre les acidités totales obtenues avec les ferments *m* et *n* dans le lait et le même lait peptonisé.

Si nous comparons la solution de lactose à la solution de maltose, nous trouvons avec cette dernière proportionnellement plus d'acides volatils et en conséquence moins d'acides fixes. L'acidité volatile varie beaucoup, du simple au quintuple, et le rapport A est très variable.

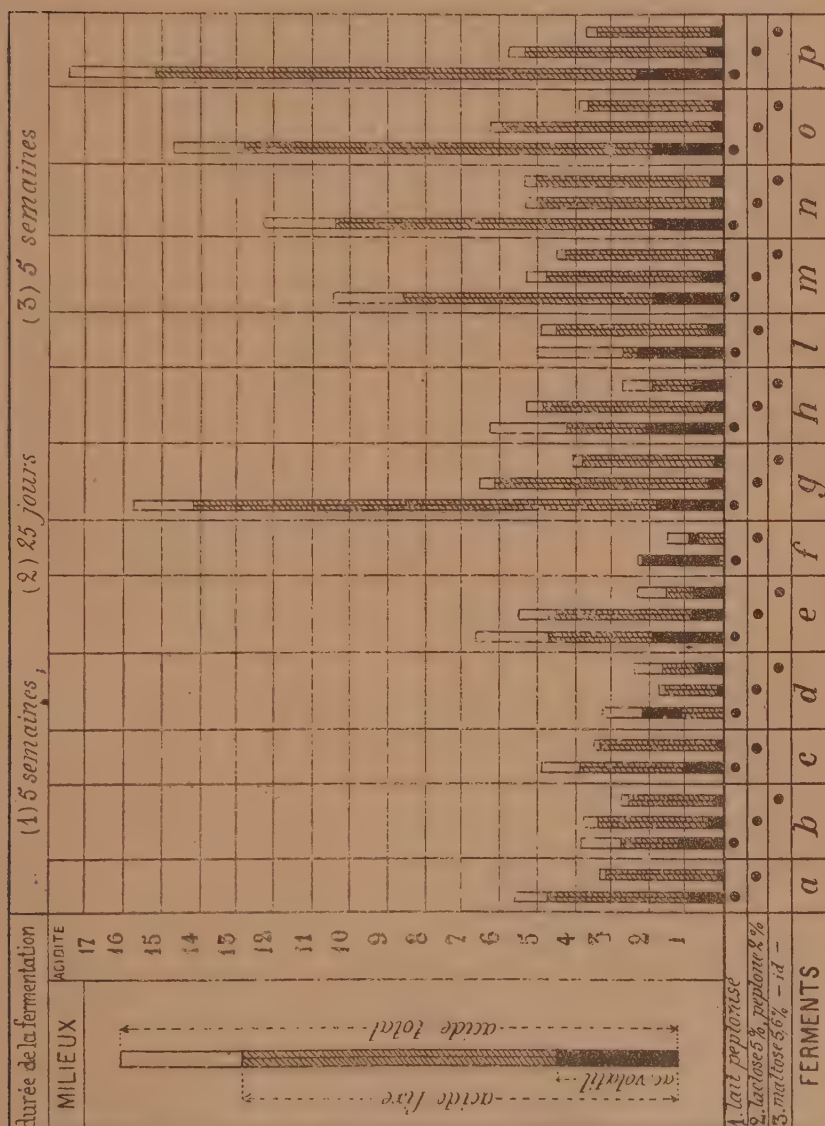
Nous voyons que les ferments lactiques sont des êtres très sensibles à la nature du milieu et à la qualité des aliments; ils préfèrent toujours les milieux naturels tels que le jus d'oignons, le jus de topinambours, aux milieux minéraux.

INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA FERMENTATION
VARIATIONS DE L'ACIDITÉ

Pendant la durée d'une fermentation lactique, le rapport entre l'acidité totale et l'acidité volatile est-il toujours le même?

S'il varie, comment varie-t-il ? Les différents ferments lactiques se comportent-ils de la même façon ? Telles sont les questions que j'ai cherché à résoudre.

En étudiant l'influence des acides et des alcools sur la fer-



GRAPHIQUE I.

mentation lactique, Hayduck est arrivé à conclure qu'au commencement de la fermentation le ferment se multiplie beaucoup, sans donner lieu à la production d'acide.

M. Richet a également remarqué que dans certaines fermentations lactiques, on pouvait constater vers le 3^e jour une diminution dans l'acidité totale.

Mais pour éclaircir davantage la question, il fallait faire des prises d'échantillons très rapprochées et assez fréquentes, afin de voir se manifester d'une façon nette les variations se produisant d'un jour à l'autre. On ne devait pas non plus se contenter de doser uniquement l'acidité totale. On ne serait, en effet, nullement renseigné sur l'allure générale de la fermentation.

Poursuivons au contraire cette variation de l'acidité pendant un grand nombre de jours, pendant des semaines et des mois, en effectuant à des intervalles déterminés, à l'aide de pipettes flambées, des prises suffisamment fortes pour doser à la fois l'acidité totale et l'acidité volatile, que nous exprimerons comme toujours en acide lactique par litre.

Mout de bière dilué.

	Ferment <i>m.</i>		Ferment <i>p.</i>	
	Acidité.	Augmentation par jour.	Acidité.	Augmentation par jour.
4 ^e jour	0.86	0.40	0.94	0.47
7 ^e —	1.76	—	2.18	—
12 ^e —	2.77	0.20	4.06	0.37
15 ^e —	2.83	—	4.72	0.22
19 ^e —	3.12	0.07	5.34	0.15
26 ^e —	3.43	0.04	5.81	0.07
33 ^e —	4.13	0.10	6.08	0.04
36 ^e —	4.33	0.07	6.12	0.01

Nous voyons que l'acidité totale augmente continuellement pour les deux ferments. Nous voyons également que l'augmentation journalière décroît régulièrement depuis le 10^e jusqu'au 36^e jour; ceci est surtout net pour le ferment *p* où cette augmentation tombe de 0^{gr},47 à 0^{gr},01. Ce même ferment *p* dans un milieu plus approprié, dans du lait préalablement peptonisé, a produit une acidité totale environ triple de celle ci-dessus, et aussi régulièrement croissante, sauf quelques légères oscillations, jusqu'au 43^e jour où elle est la plus forte. L'acidité fixe varie

dans le même sens, ce qui veut dire que l'acidité volatile n'a varié que dans de faibles limites. Le rapport A est resté à peu près constant.

Tous les ferments lactiques se comportent-ils de la même façon? N'y en a-t-il pas qui, à un moment donné, comme l'a déjà signalé M. Richet, font disparaître l'acide produit, qui les gêne, pour en produire ensuite de nouvelles quantités?

Pour le savoir, j'ai fait un très grand nombre d'expériences avec les différents ferments que j'avais à ma disposition. J'ai vu que, sous ce point de vue, on pouvait les classer en deux grands groupes, ceux qui font disparaître partiellement, à un certain moment, l'acidité formée, et ceux chez lesquels l'acidité croît sans discontinuer, ou est tout au plus sujette à de légères oscillations.

Dans le premier groupe il faut ranger les ferments de lacterie, de la crème, *a*, *b*, *c*, *r*, auxquels il convient de rattacher le ferment *s* de la mammite contagieuse des vaches, les ferments *d* et *f*; tous les autres, ceux de la distillerie, de la brasserie, du jus de choucroute doivent être compris dans le 2^e groupe.

Nous avons donné un exemple emprunté à ce second groupe. En voici un emprunté au premier. Le ferment *b* a été ensemencé dans de l'eau de touraillons peptonisée, additionnée de quantités croissantes de lactose par litre. Voici la marche de l'acidification.

Acidité en acide lactique par litre.			
	A.	B.	C.
	+ 0.50/0 lactose.	+ 0.250/0 lactose.	+ 0.125 0/0 lactose.
Après 1 jour	1gr,340	1gr,090	1gr,008
— 2 —	1 ,197	1 ,176	—
— 3 —	1 ,124	1 ,124	—
— 4 —	1 ,134	1 ,194	—
— 5 —	1 ,145	1 ,090	—
— 6 —	1 ,050	—	—
— 7 —	1 ,113	—	—
— 8 —	1 ,090	—	—
— 9 —	1 ,090	—	—
— 10 —	1 ,082	—	—
— 11 —	1 ,071	—	—

Nous voyons que, pour le ferment *b* de la crème, l'acidité augmente rapidement, puis diminue et semble soumise à des

oscillations continues; elle se maintient finalement à un niveau à peu près constant, soit de 1^{gr},080 par litre. Chose singulière, ce titre définitif est à peu près le même pour les 3 matras qui renfermaient pourtant à l'origine des quantités de sucre différentes, variant de 1 dans le matras C à 4 dans le matras A.

Le matras C a été arrêté au bout de 24 heures, le matras B au bout de 5 jours; les deux cultures sont pures, les liquides ne réduisent plus la liqueur de Fehling; le matras A, le plus riche en sucre, a fermenté pendant 11 jours. A ce moment, j'y remarque un petit îlot de *penicillium glaucum* et j'arrête l'expérience.

Les liquides B et C sont soumis à la distillation fractionnée d'après la méthode de M. Duclaux; je trouve de l'acide acétique avec un peu d'acides supérieurs; je l'exprime en acide lactique.

Nous en avons ainsi pour B : 0^{gr},085 par litre.

C : 0^{gr},080 —

Ce qui fait, en acide fixé, par différence

pour B : 1^{gr},010

C : 0^{gr},923

et, pour les rapports A, pour B : 11,8

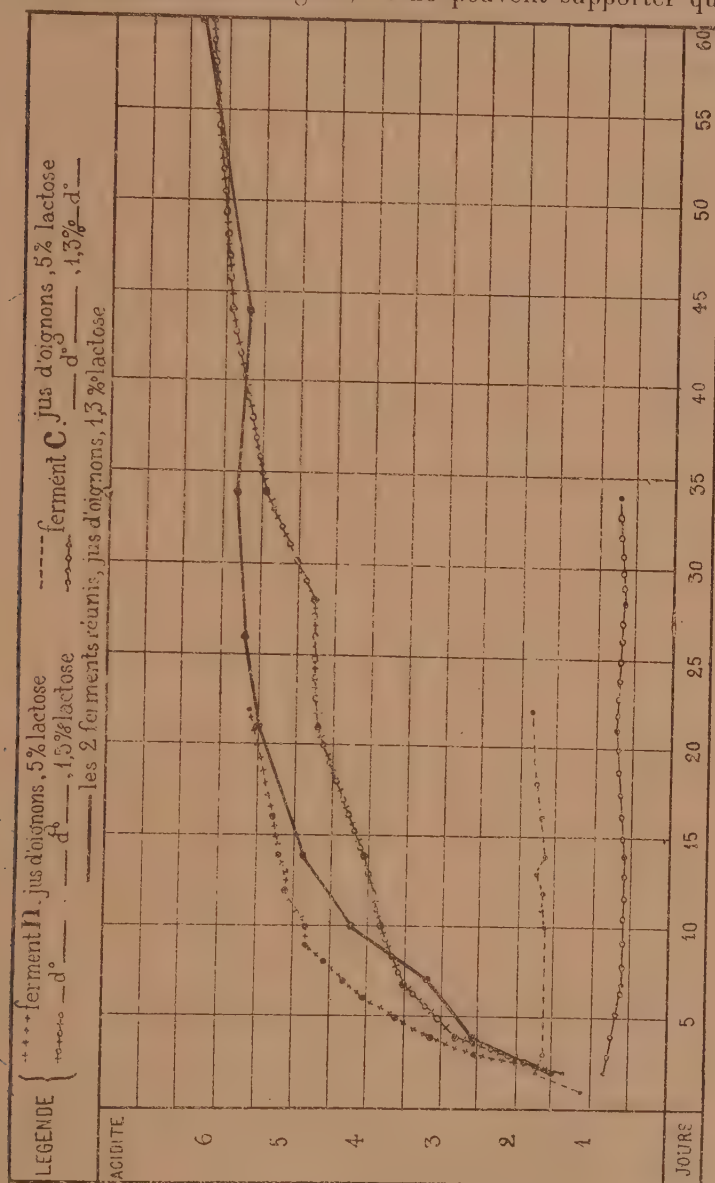
C : 11,5

c'est-à-dire sensiblement le même nombre. Les deux liquides ont donc fermenté de la même façon.

Entre ces deux formes pour ainsi dire extrêmes de la marche de l'acidification, on relève des formes intermédiaires dont les fig. II et III peuvent donner une idée. Les courbes de la fig. II indiquent la marche progressive de l'acidité produite par les ferments *c* et *n* dans du jus d'oignons additionné de 1^{gr},3 et de 5 grammes de lactose par litre. On voit qu'avec le ferment *n*, l'acidité s'élève vite et reste ensuite à peu près constante, sauf quelques variations, comme si le microbe procédait simultanément à la fabrication de nouvel acide et à la destruction de l'acide formé. Avec le ferment *c*, dans le même milieu, l'acidité reste plus faible et à peu près constante.

Les tracés de la fig. III donnent d'autres exemples de la marche de l'acidification. La conclusion générale qui résulte de l'ensemble de ces faits peut se résumer en ceci : il y a d'ordinaire un moment où la combustion de l'acide formé commence, ce moment est celui où le ferment commence à se sentir mal à

l'aise dans le milieu de culture. Pour quelques ferments, la gène commence dès l'origine, ils ne peuvent supporter que la

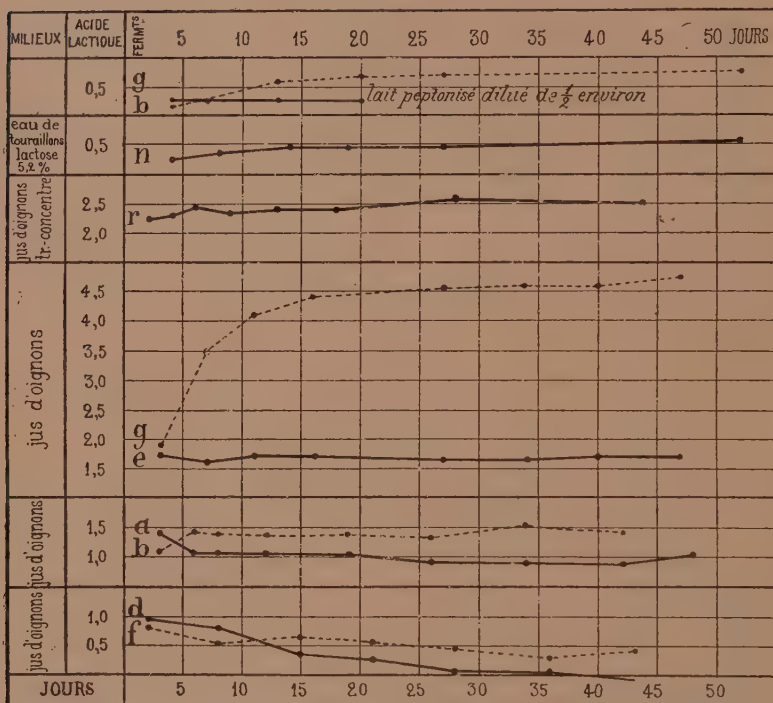


GRAPHIQUE II.

Dans ce graphique, il faut lire jus d'oignons avec 5 0/00 de lactose, au lieu de 5 0/0.

présence de faibles quantités d'acide, ils élèvent donc très peu l'acidité du milieu. Les autres l'élèvent beaucoup, mais par là ils se créent à eux-mêmes des conditions défavorables, et dès ce moment, ils brûlent ou détruisent l'acide formé.

VARIATIONS DE L'ACIDITÉ POUR QUELQUES FERMENTS



GRAPHIQUE III.

Par quoi se traduit cette combustion? nous allons le voir en étudiant séparément la marche de l'acidité fixe et de l'acidité volatile avec le ferment *s* de la mammite contagieuse.

Ce ferment *s* passe très nettement par un maximum, comme on le voit par les deux expériences ci-après, donnant toujours l'acidité en acide lactique par litre.

Expérience A. — Jus d'oignons.

	A. T.	A. V.	Ac. Fixe.	Rap. A.
Après 4 jours	0,581	0,259	0,322	1,250
— 8 —	0,817	0,439	0,378	0,860
— 26 —	0,559	0,492	0,067	0,013

Expérience B. — Jus d'oignons.

	A. T.	A. V.	Ac. Fixe.	Rap. A.
Après 11 jours	0,720	0,368	0,352	0,95
— 15 —	0,698	0,419	0,279	0,66
— 21 —	0,585	0,491	0,094	0,49
— 28 —	0,473	0,410	0,063	0,15
— 46 —	0,900	0,867	0,033	0,04

On voit que l'acide fixe diminue, tandis que l'acidité volatile augmente; finalement il ne reste plus d'acidité fixe; tout le sucre semble transformé en acides volatils (acide acétique), ce qui a lieu, comme nous le verrons plus loin, dans les cultures en surface.

INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA SEMENCE

Lorsqu'on prélève des bacilles dans des cultures d'âge différent et qu'on les ensemence dans un même milieu fermentescible, montrent-ils toujours la même activité? Quelle est l'influence de l'âge de la semence?

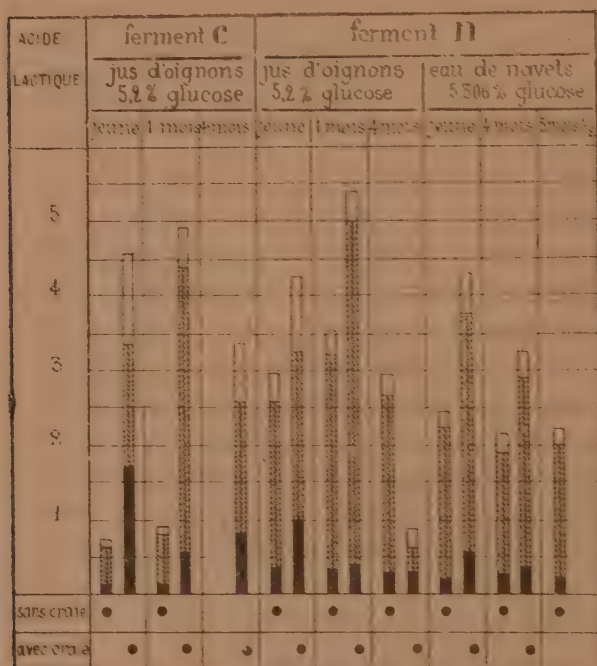
M. Grimbert nous a montré, pour le *bacillus orthobutylicus*, que l'âge des microbes mis en jeu peut avoir une influence capitale sur la marche d'une fermentation.

J'ai fait plusieurs expériences dans le même ordre d'idées et j'ai trouvé pour les ferments lactiques des faits tout à fait analogues à ceux signalés par M. Grimbert.

Quelques essais préliminaires m'ayant montré que les ferments lactiques, conservés dans un milieu liquide additionné de craie, conservent très longtemps leur activité et leur puissance coagulante sur le lait, qu'en revanche, leur conservation sur milieu solide les fait plus rapidement dégénérer, j'ai dû, pour étudier la variation d'activité avec l'âge, conserver les semences

dans un milieu sans craie. et. pour éviter l'influence du changement de milieu. les réensemencer dans un liquide identique à celui qui les avait conservées. A divers intervalles. d'un mois. de quatre mois. on faisait une culture nouvelle et on comparait les résultats. Comme terme de comparaison. on faisait simultanément chaque fois une culture dans le même milieu additionné de craie.

Le tableau suivant résume mes résultats. On voit que pour



GRAPHIQUE IV.

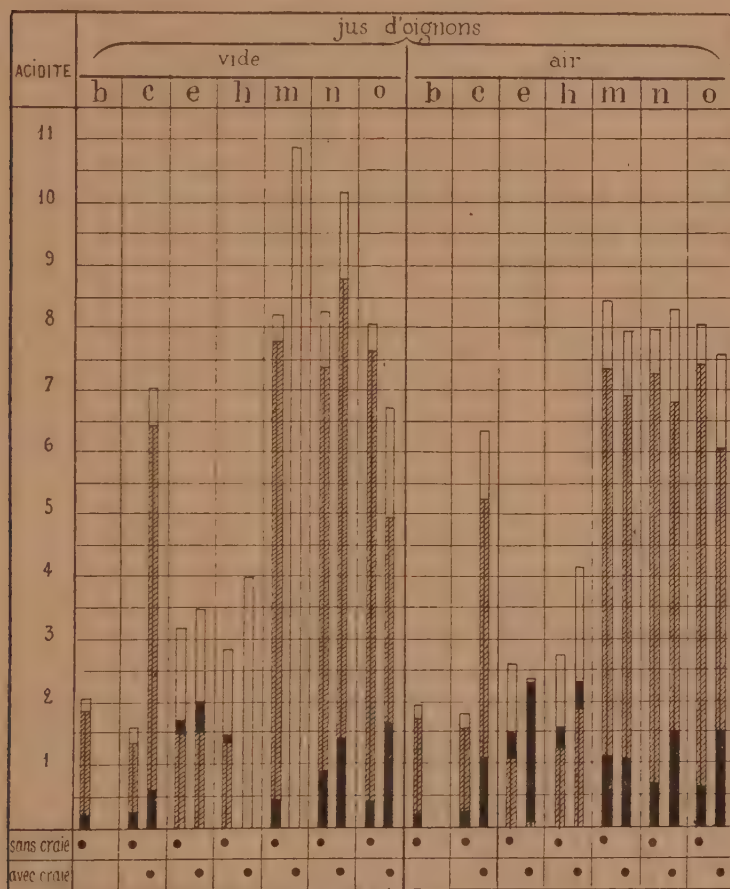
Les proportions de glucose sont en millièmes et non en centièmes comme cela est indiqué par erreur.

les deux ferments dans le jus d'oignons. c'est la semence âgée d'un mois qui est la plus active. tant en présence de la craie qu'en son absence. Dans l'eau de navets. au contraire. c'est la semence jeune qui se comporte le mieux. Partout. la fermentation en présence du carbonate de chaux est plus active qu'en son absence.

INFLUENCE DE L'AIR

Les ferments lactiques sont-ils aérobies ou anaérobies ?

D'après les recherches de M. Hueppe, la présence de l'air est nécessaire à la fermentation lactique ; M. Richet a constaté que l'oxygène peut l'activer beaucoup ; M. Mayer a vu, au contraire que la fermentation lactique était possible en l'absence d'air.



GRAPHIQUE V.

Oppenheimer a trouvé, en opposition avec Baginsky, que l'absence d'oxygène donnait lieu à plus d'acide lactique et à moins d'acides volatils ; c'est ainsi qu'il n'a trouvé que de l'acide lactique dans les fèces des nourrissons.

Nous allons voir que tous les cas sont possibles, et que le ferment lactique considéré intervient en première ligne.

J'ai stérilisé 80 c.c. de jus d'oignons avec ou sans craie dans des tubes étirés ; le liquide y occupait une longueur de 11 centimètres, de sorte que la culture peut être considérée comme ayant eu lieu en profondeur.

Ces tubes ont été ensemencés avec les ferments *b*, *c*, *e*, *g*, *h*, *m*, *n* et *o* ; la moitié est fermée par un bouchon de coton ; l'autre moitié est scellée à la lampe, après y avoir fait le vide préalablement à la trompe à eau.

Ils sont abandonnés pendant six semaines à l'étuve et analysés.

On voit, en comparant les mêmes ferments dans les deux moitiés du tableau suivant ou du graphique V, qu'ils sont en moyenne plus actifs lorsqu'ils agissent dans le vide qu'en culture profonde au contact de l'air.

	VIDE						AIR					
	AVEC CRAIE.			SANS CRAIE.			AVEC CRAIE.			SANS CRAIE.		
	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi
<i>b</i>	—	—	—	2.030	0.195	4.835	—	—	—	4.973	0.205	4.768
<i>c</i>	7.054	0.596	6.458	1.635	0.243	4.392	6.358	4.449	5.239	4.804	0.230	4.574
<i>e</i>	3.537	2.056	4.481	3.204	1.713	4.494	2.368	2.308	0.060	2.614	1.844	4.100
<i>g</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.253	0.360	5.893
<i>h</i>	4.044	—	—	2.829	1.439	1.390	4.140	2.291	4.849	2.745	1.543	4.202
<i>m</i>	10.902	—	—	8.204	0.443	7.761	7.954	4.050	6.904	8.487	4.105	7.382
<i>n</i>	10.180	4.402	8.778	8.261	0.849	7.412	8.309	4.537	6.772	7.978	0.694	7.284
<i>o</i>	7.776	4.650	6.126	8.091	0.414	7.677	7.580	4.510	6.070	8.034	0.617	7.417

La présence de l'air égalise davantage les deux cultures avec et sans craie, en diminuant l'activité de la première pour tous les ferments, sauf pour *o*, pour lequel elle l'augmente légèrement. Il est à remarquer que pour ce ferment *o*, et contrairement aux autres, la fermentation en présence du carbonate de chaux est moins active qu'en son absence.

Nous avons observé le même fait, pour le ferment *n*, à différentes reprises.

Il importe de faire remarquer la grande différence de l'acidité fixe produite par le ferment *c* dans les tubes avec et sans craie, dans le vide et dans l'air ; il n'est pas moins curieux de voir que l'acidité volatile est partout plus élevée que l'acidité fixe, aussi bien dans le vide que dans l'air pour les deux ferments *e* et *h*.

CULTURES EN SURFACE ET EN PROFONDEUR

Les cultures faites au contact de l'air dans l'expérience précédente l'avaient été dans des tubes profonds et étroits : il était donc indiqué de rechercher ce qui arrive quand on fait des cultures en large surface et en petite profondeur. Je me suis servi pour cela des ferments *b*, *m*, *n* et *o* des essais précédents, que j'ai cultivés comparativement dans des matras larges et dans des tubes longs et étroits. La fig. VI résume quelques-unes de mes expériences. Les liquides de culture ont été du jus d'oignons additionné de 7^{gr},53 et de 10^{gr},54 de glucose par litre; de l'eau de touraillons, contenant 13^{gr},3 de glucose et 5 grammes de peptone par litre; enfin, de l'eau de choux.

On voit que pour le ferment *m*, qui ne figure que dans un essai, l'acidité totale est à peu près la même, mais que l'acidité volatile est plus grande et l'acidité fixe plus faible en surface et au large contact de l'air. Le rapport A varie de 4,6 à 20,9. Pour le ferment *n*, l'acidité totale dans la culture en profondeur dépasse toujours ce qu'elle est au libre contact de l'air. Le rapport A entre l'acide fixe et l'acide volatil est aussi toujours plus faible en surface. Pour *o*, la culture en profondeur donne plus d'acide dans l'eau de choux, moins dans le jus d'oignons sucré. Pour *b*, dans ce dernier milieu, il n'y a presque pas de différences, et en résumé on voit que les ferments lactiques se comportent de façons très variées vis-à-vis de l'oxygène. Les uns sont plus anaérobies, les autres plus aérobies.

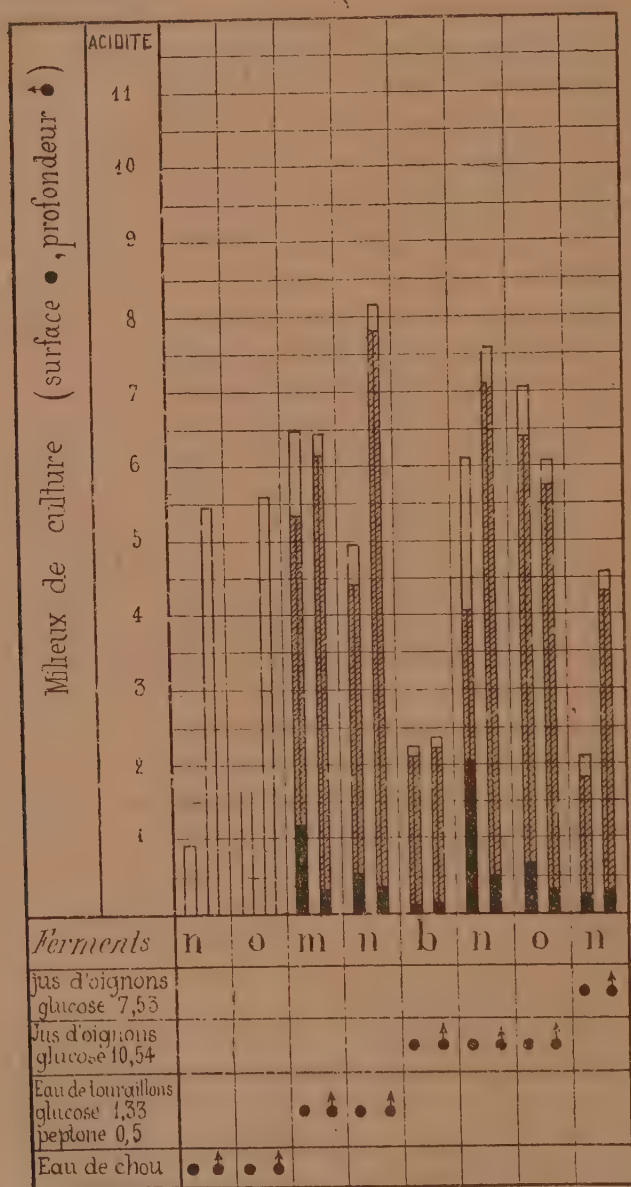
Il est curieux de chercher quel est dans ces deux modes d'existence le rapport entre le sucre disparu et l'acide formé. Ce rapport devrait être l'unité si la transformation se faisait suivant la formule théorique :



S'il y a combustion complète d'une partie du sucre, ou d'une partie de l'acide formé, le rapport entre le sucre originel et l'acide trouvé à la fin de la fermentation doit tomber au-dessous de l'unité, et d'autant plus que la combustion est plus vive.

Or on trouve que pour 100 grammes de glucose disparu, *n* a donné, dans les trois derniers essais du tableau, 93,8; 94,0; 95,3 d'acide fixe dans la culture en profondeur, tandis qu'on ne

trouvait respectivement que les nombres 70, 60,9, 62,4 dans la culture en surface.



GRAPHIQUE VI.

Pour Δb , nous trouvons les nombres 80,6 en surface et

74,6 en profondeur; pour *o*, de même, les nombres 98,9 et 100. Nous avons vu que ce dernier microbe était presque indifférent à la présence du vide ou à celle de l'air, à la présence ou à l'absence de carbonate de chaux. Pour les autres, la proportion de sucre retrouvée à l'état d'acide fixe est plus grande en profondeur qu'en surface. Dans ce dernier cas, il y a toujours combustion.

INFLUENCE DE LA MATIÈRE AZOTÉE

MM. Richet et Hueppe ont déjà signalé l'influence qu'exerce sur la fermentation lactique la nature de l'aliment azoté, mais ils ne se sont pas demandé d'où provenait cette influence. La matière albuminoïde sert-elle seulement à fournir au ferment l'azote qui lui est nécessaire, ou bien contribue-t-elle pour sa part à la formation de l'acide lactique? Pour répondre à cette question, il fallait d'abord chercher quel était l'aliment azoté le plus assimilable et le plus actif. J'ai trouvé que c'était la peptone.

Le graphique VII résume les expériences relatives à l'influence de la peptone, et met en évidence deux faits principaux :

Le premier est que l'addition de peptone augmente toujours le titre acide du milieu de culture, que le ferment soit inerte ou vigoureux. Le second est que le titre acide monte parfois au-dessus du chiffre qui correspond au dédoublement pur et simple de tout le sucre fermentescible contenu dans la liqueur, comme si une portion de cet acide lactique provenait de la peptone. Pour savoir s'il en est réellement ainsi, il n'y avait qu'à cultiver les ferments dans une solution de peptone.

Des solutions à 1 et 2 0/0 de la peptone Chapoteaut, qui ne réduisaient la liqueur de Fehling ni avant le traitement par l'acide chlorhydrique ni après, ensemencées avec divers ferments lactiques, m'ont toujours donné de l'acide lactique, reconnaissable par son sel de zinc.

On aurait pu dire que cette peptone contenait peut-être des substances hydrocarbonées différentes des sucres, et pourtant capables de subir la fermentation lactique. Pour éviter cette objection, j'ai peptonisé du blanc d'œuf en solution chlorhydrique à la température de 30° : le liquide a été neutralisé et

Voici les acidités obtenues en acide lactique par litre, dans des tubes contenant 10 c. c. de liquide :

<i>c</i>	0.210	<i>m</i>	0.095
<i>e</i>	0.063	<i>n</i>	0.323
<i>g</i>	0.437	<i>o</i>	0.210

Deux matras contenant plus de liquide avaient été ensemencés avec les ferments *n* et *o*; l'acidité totale du matras *o* était de 0,176 0/00 ou à peu près le douzième de la matière azotée¹. Le résidu de l'évaporation épuisé par l'éther m'a donné du lactate de zinc, reconnaissable au microscope et par l'oxyde de zinc obtenu par calcination; j'ai transformé le lactate de zinc en lactate de chaux qui est bien plus propre à démontrer la présence d'acide lactique.

Pour voir si les ferments lactiques avaient conservé leur première puissance, j'ai ensemencé comparativement dans du jus d'oignons et dans du lait la semence du matras fermenté avec le blanc d'œuf peptonisé et celle d'une culture ordinaire.

J'ai constaté que la semence provenant de la culture du blanc d'œuf peptonisé fait cailler le lait un peu plus lentement; j'ai vu aussi que l'acidité obtenue dans le jus d'oignons a diminué.

	Acidité en ac. lact. par litre.	
Semence <i>n</i> blanc d'œuf.....	4.664	} 4 ^{gr} ,598
— — — — —	4.532	
— <i>n</i> ordinaire.....		5,720

Ainsi le ferment qui a poussé dans l'albumine est resté un ferment lactique.

Un autre blanc d'œuf peptonisé, avec 10,45 0/00 d'extrait, m'a encore fourni des lactates de zinc, avec les ferments *n* et *o*.

L'acidité obtenue par litre était de 0,882 pour le ferment *n*, et de 0,819 pour le ferment *o*.

Un troisième blanc d'œuf peptonisé m'a donné des lactates de zinc avec les ferments *b*, *n* et *o*.

1. Le matras *n* avait pris une teinte jaune foncé et était alcalin; quelques centimètres cubes mis dans un tube à essai avec une trace de carbonate de magnésie et portés à l'ébullition ont donné un dégagement net d'ammoniaque: le tube témoin traité de la même façon n'a rien dégagé.

Le liquide *n* a été soumis à la distillation avec du carbonate de magnésie et j'obtiens 0,643 0/00 d' AzH_3 ; l'acidité totale était de 0,114 0/00 en acide lactique; la distillation fractionnée a révélé des traces d'acide propionique. J'obtiens du lactate de zinc.

Pour éviter toute objection de nature à faire croire que c'est peut-être la trace de substances hydrocarbonées existant dans l'œuf qui aurait donné lieu à une production lactique, j'ai précipité le blanc d'œuf par l'acide chlorhydrique, j'ai versé le précipité sur un filtre et lavé abondamment avec de l'eau chaude.

Le précipité a été ensuite peptonisé par un peu d'acide chlorhydrique additionné de pepsine; cette solution est neutralisée et stérilisée. J'obtiens des quantités appréciables de lactates de zinc pour les ferments *c*, *e* et *o*.

J'ai enfin fait une dernière expérience avec la fibrine peptonisée.

La fibrine fraîche, bien lavée et très blanche, est mise à digérer à la température de 30° avec une solution diluée d'acide chlorhydrique et de pepsine.

Elle est filtrée et neutralisée : le liquide soumis à l'expérience donne 9,3 0/00 d'extrait avec 1,03 0/00 d'azote ou 6,44 0/00 de matières albuminoïdes.

J'ensemence les ferments *h*, *e* et *n* : la fermentation dure trois semaines; les matras *e* et *h* sont acides; le matras *c* indique une acidité de 0,315 0/00; le matras *n* est jaune et alcalin; j'obtiens partout des lactates de zinc.

Il semble donc nettement démontré que les ferments lactiques sont aptes à faire de l'acide lactique aux dépens de la matière azotée pure; mais ce n'est pas tout.

Du moment qu'ils sont si sensibles à la présence ou à l'absence de la matière azotée, il était à prévoir qu'ils seraient riches en azote; il fallait donc songer à les recueillir, à les peser et à y doser l'azote, en faisant varier les conditions de l'expérience.

Leur étude à ce point de vue a donné lieu à des conclusions intéressantes.

Il faut d'abord dire que les ferments lactiques, excessivement minces, passent très aisément à travers les pores du papier Berzélius; il y en a qu'on n'arrive jamais à retenir complètement : c'est cette circonstance qui m'a empêché, dans tous les essais qu précèdent, de prendre le poids de ferment comme critérium de l'intensité de l'action, et à m'adresser uniquement pour cela à la quantité et à la qualité des acides produits.

Première expérience.

J'ensemence les ferments *l* et *p* dans du lait peptonisé, je retiens les deux ferments sur une petite bougie-Chamberland en communication avec une trompe à eau par l'intermédiaire d'un petit flacon.

Les poids des ferments trouvés ont été, après traitement par l'éther pour enlever la matière grasse, par litre :

Pour <i>l</i>	0.203	ayant donné une acidité de.....	5.59	0/00	ac. lact.
— <i>p</i>	0.683	— — —	12.64	—	—
Ou 1 gramme de ferment a donné pour <i>l</i>			27.5	gr. ac. lact.	
— — —			<i>p</i>	18.5	— —

Deuxième expérience.

Dans cette expérience j'ai cherché à éviter la précipitation de la matière albuminoïde sous l'influence de l'acide lactique, en la précipitant préalablement par le même acide.

Le milieu de culture est le lait peptonisé. Après addition de 0^{gr},882 d'acide lactique par litre, le lait a été bouilli, filtré, neutralisé et ensemencé avec les ferments *b*, *n*, *o*; les ferments ont été ensemencés en double; la fermentation a duré 2 mois 1/2; l'examen microscopique ne révèle rien autre chose que des ferments lactiques; la filtration a lieu à travers des filtres tarés de papier Berzélius; les ferments *n* et *o* s'y prêtent admirablement, ils sont entièrement retenus : pour *b* j'en ai perdu un peu; le tableau suivant nous indique les acidités produites, le poids du ferment par litre, ainsi que la teneur en azote 0/0 :

Quantités par litre.

Ferment.	Poids du ferment.	Ac. Tot. produite.	A. V.	A. Fi.	Azote du ferment.
<i>b</i> 1	0.080	0.878	0.124	0.754	—
» 2	0.062	0.878	0.128	0.750	—
<i>n</i> 1	0.537	9.062	1.210	7.852	—
» 2	0.590	9.744	1.012	8.732	9.9 0/0
<i>o</i> 1	0.500	11.284	1.407	9.877	11.8 0/0
» 2	0.617	9.810	1.012	8.798	10.8 0/0

Les filtres *n* 2 et *o* 2 ont filtré très rapidement; nous trouvons dans ces deux matras une acidité fixe de 8,732 et de 8,798 avec

0^{gr},590 et 0^{gr},617 de ferment, ou par gramme de ferment 14^{gr},8 et 14^{gr},3 d'acide lactique produit; rapports très voisins et un peu inférieurs à ceux de la précédente expérience, où nous avons considéré l'acidité totale.

Je dois également signaler la forte richesse en azote des ferments : nous trouverons bientôt une relation directe entre la teneur en azote du ferment, la richesse du milieu et les conditions de culture (surface et profondeur).

Rappelons d'abord quelques chiffres d'une expérience que nous avons examinée un peu plus haut.

Eau de touraillons : 13,3 0/00 de glucose.

	Acidité en acide lactique 0/00.			
	m.		n.	
	Acidité.	Sucre disparu.	Acide fixe.	Sucre disparu.
Culture en profondeur.	6,146	6,80	7,603	8,10
— surface.....	5,340	7,58	4,398	5,48

Comparons maintenant les poids des ferments produits, des acides fixes formés et des sucres disparus ; un accident m'a fait perdre le ferment *m* pour la culture en profondeur.

	Acidité par litre.					
	Ferment <i>m</i> .			Ferment <i>n</i> .		
	Poids du ferment.	Ac. Fi.	S. D.	Poids du ferment.	Ac. Fi.	S. D.
Profondeur.	—	6,146	6,80	0,386	7,603	8,10
Surface	0,460	5,340	7,58	0,333	4,398	5,48

Nous trouvons que *un* gramme de ferment a fait disparaître

	Sucre.	Acide fixe produit.
<i>m</i> surface	16 ^{gr} ,4	11,6
<i>n</i> surface.....	16 ^{gr} ,4	13,2
<i>n</i> profondeur.....	20 ^{gr} ,9	19,7

Troisième expérience.

Le milieu de culture est du jus d'oignons avec 10,54 0/00 en glucose ; il a étéensemencé avec le ferment *n*.

L'examen microscopique montre le ferment plus beau en profondeur.

	Quantités par litre.				
	Ac. Tol.	A. Vo.	Ac. Fi.	S. disparu.	Poids du ferment.
Profondeur..	7.590	0.490	7.100	7.55	1.467
Surface.....	6.116	2.040	4.076	6.70	1.147

	Quantités correspondant à un gramme de ferment.		
	Sucre disparu.	A. T. formé.	Ac. Fi.
Profondeur...	5.153	5.173	4.840
Surface.....	6.356	5.323	3.554

L'expérience nous montre de plus qu'il reste du sucre réducteur non attaqué, et qu'en conséquence, dans la culture en profondeur, une partie de l'acidité totale provient sûrement d'une autre matière que le glucose.

Les ferments avaient les teneurs en azote suivantes; je les ai comparés à une culture de *mycoderma aceti*:

Azote 0/0.	
<i>n</i> en profondeur.....	4.17
<i>n</i> en surface.....	6.51
<i>Mycoderma aceti</i>	4.81

Ces nombres sont comparables entre eux; mais il est curieux de voir que le ferment en surface est plus riche en azote.

Ces nombres sont de plus inférieurs à ceux trouvés antérieurement, ceci dépend uniquement de la richesse du milieu en azote, nous le verrons bientôt.

Quatrième expérience.

Le milieu de culture est du jus d'oignons avec 22,05 0/00 d'extrait et 7,53 de sucre réducteur; le ferment ensemencé est le ferment *n*.

	Ac. Fi. 0/00.	S. Disparu 0/00.	Azote du ferment 0/0.
Profondeur.....	4.257	4.47	9.51
Surface.....	1.799	2.83	13.58

Nous constatons à nouveau que le ferment en surface est plus riche en azote.

Le tableau suivant nous montre encore la grande influence qu'a la richesse en peptone du milieu.

Quantités par litre.

	A. Moût primitif.	
	Extrait.	Azote.
Jus d'oignons.....	10.40	0.135
Jus d'oignons + 0,92 0/0 peptone.....	19.65	0.850

	B. Moût fermenté. — Ferment n.					Ferment.	
	Extrait.	Ac. To.	A. Vo.	A. Fi.	Azote.	Poids.	Az. 0/0.
Jus d'oignons.....	8.20	2.790	0.401	2.389	0.130	0.173	10.72
Jus d'oignons + 0,92 0/0 pept.	16.60	5.832	0.467	5.365	0.720	0.380	12.84

Nous voyons d'abord la confirmation de ce que nous savions, que la peptone agit surtout sur l'acidité fixe, que c'est dans le matras additionné de peptone que l'acidité est la plus élevée; en plus, nous constatons que c'est encore dans le même matras que nous trouvons le poids le plus élevé de ferment; celui-ci est en même temps le plus riche en azote.

La richesse en azote du ferment peut atteindre un chiffre très élevé, de façon à ressembler à de la matière albuminoïde.

Voici un moût de bière avec 8,5 0/00 de maltose; il estensemencé avec le ferment *m* de la distillerie; la fermentation a duré 14 semaines.

Le moût fermenté dosait 6,41 0/00 de maltose, et une partie de l'acide lactique fourni provenait sans doute de la dextrine attaquée directement ou préalablement transformée par l'acide lactique produit.

L'acidité totale est de 3,68 0/00, l'acidité volatile de 0,339 0/00, l'acidité fixe de 3,341; le poids du ferment est de 0,092; donc un gramme de ferment a donné lieu à 36.3 d'acide fixe; ce ferment, très gros au microscope, dosait 15 0/0 d'azote.

Nous avons déjà passé en revue de nombreuses expériences concernant la variation de l'acidité; il restait à voir la variation de la richesse en azote d'un ferment pendant la durée d'une fermentation; le ferment *m* s'y prêtait très-bien, car on peut le retenir entièrement sur le filtre.

Le milieu de culture est du moût de bière préparé au laboratoire avec un mélange de malt, d'avoine et de blé germés, à raison de 1 3 de chaque; j'y ai fait des prises à trois intervalles

déterminés avec des pipettes flambées, à raison de 250 à 300 c. c. chaque fois.

Variation de l'Azote dans un ferment.

	Quantités par litre. — Ferment <i>m</i> .		
	1 ^{re} prise. Après 3 jours.	2 ^e prise. 12 jours.	3 ^e prise. 45 jours.
Moult primitif (maltose).....	28,52	—	—
Moult fermenté —	22,89	—	21,01
Acidité totale.....	8,674	6,316	7,576
Acidité volatile.....	0,355	0,485	0,606
Acidité fixe.....	3,319	5,731	6,970
Rapport A.....	9,4	11,8	11,5
Poids du ferment.....	0,342	0,303	0,322
Azote 0/0 du ferment.....	9,1	10,8	11,83
Azote du moult témoin.....	0,690	—	—
Azote du moult fermenté.....	0,658	—	—

Ce tableau nous montre comment l'acidité va régulièrement en croissant; le rapport A nous indique que l'acide fixe augmente proportionnellement jusque vers le 12^e jour. Nous remarquons, en outre, que les poids du ferment, 0^{gr},342, 0^{gr},303, 0^{gr},322 sont sensiblement pareils, pour autant que la prise et l'agitation préalable l'ont permis.

On voit de plus qu'à partir d'un certain moment le ferment cesse de se multiplier; c'est vers le 12^e jour que le ferment *m* semble être à son maximum de puissance, c'est alors que le rapport A est maximum; mais, ce qu'il y a de curieux, c'est que la proportion d'azote du ferment varégulièrement en augmentant, et c'est le ferment de 45 jours qui est le plus riche en azote.

En résumé la matière azotée intervient dans la fermentation lactique d'une façon très énergique, non seulement par sa quantité, mais encore par sa qualité.

Cette intervention imprévue de la matière azotée dans la production de l'acide lactique empêche d'attribuer un sens tout à fait précis aux nombres que nous avons trouvés dans le paragraphe précédent pour le rapport entre le sucre disparu et l'acide produit. Il faut d'autant plus se défier de l'exactitude absolue de ce rapport que j'ai vu une addition de 2,5 0 0 de peptone par litre dans de l'eau de touraillons faire monter l'acidité au double de ce qu'elle était avec une addition de 2 grammes de lactose par litre.

De même, il devient très difficile de savoir comment un ferment se comporte avec les diverses substances sucrées, qu'il faut nécessairement introduire dans des milieux de culture très favorables, puisque, en dehors des sucres ordinaires, elles sont assez résistantes aux ferments. Or, dans ce milieu favorable, il est assez difficile de faire la part de ce qui revient au sucre, distraction faite de ce qui revient à la substance azotée.

Enfin, nous allons nous heurter à cette influence de la matière azotée en étudiant la relation entre la constitution et le pouvoir rotatoire du sucre et le pouvoir rotatoire de l'acide formé. Mais avant d'aborder cette partie du travail, il faut d'abord établir quelques notions préliminaires.

ÉTUDE DES SELS. — LACTATES DE ZINC

Lieber a déjà signalé pour les différents lactates de zinc et de calcium les différences en eau de cristallisation; après lui *Fugèlhardt* et *Moritz*, *Wiskowsky* et *Hantz* ont trouvé que ces sels se différencient par la formation des cristaux, leur eau de cristallisation, leur facilité plus ou moins grande de perdre cette eau, leur solubilité et leur pouvoir rotatoire.

Ces savants ont trouvé que les lactates de zinc inactifs cristallisaient avec $3H_2O$, les lactates actifs avec $2H_2O$; que les lactates de zinc inactifs perdaient vite leur eau de cristallisation, même à 100° , tandis que les lactates actifs mettaient souvent des heures.

J'ai vu, comme *Engelhardt* l'avait déjà signalé, que les lactates inactifs perdent très facilement leur eau de cristallisation, et qu'il y a une grande différence entre le sel gauche et le sel droit. Ce dernier perd bien plus facilement l'eau de cristallisation; les dernières traces seules s'en vont difficilement. C'est ainsi que le sel droit perd toute son eau par un chauffage d'une demi-heure à 140° , pendant que le sel gauche en a à peine perdu la moitié; ce fait est en relation avec la plus grande solubilité des sels gauches.

Engelhardt a trouvé que les lactates de zinc gauches sont plus solubles que les lactates inactifs. Pour étudier leur solubilité, j'ai mis ces sels en excès dans 20 à 30 c. c. d'eau distillée: ces solutions sont abandonnées, en aguant de temps à autre, dans un bain-marie maintenu à 20° à l'aide d'un régulateur Etienne.

Un volume quelconque du liquide clair est pesé dans une capsule tarée, puis évaporé et séché à 30°; voici les résultats obtenus :

1 ^{er} lactate de zinc inactif.....	4.747 0/0.	T. — 20°
2 ^e — —	4.769 0/0.	
2 ^e lactate porté préalablement à 30°.	2.305	
1 ^{er} lactate de zinc droit.....	5.242	
2 ^e — —	5.232	
1 ^{er} lactate de zinc gauche.....	5.439	
2 ^e — —	5.347	
Lactate de chaux inactif.....	4.911	
Lactate de chaux gauche.....	6.643	
Lactate de cadmium inactif.....	11.03	
Lactate de cadmium gauche.....	135.30	

Les sels actifs sont donc plus solubles que les sels inactifs; ce sont les lactates de cadmium qui sont les plus solubles.

L'élévation de la température à 30° a permis d'augmenter la solubilité du lactate de zinc inactif d'environ 0,5 0/0. Dans un mélange de sels gauches et de sels droits, ce sont les sels gauches qui cristallisent les derniers.

Wislicenus, *Klimenko* ont constaté que la dilution du lactate gauche augmentait la rotation. *Schardinger* a fait la même observation pour le lactate droit.

Voici ce que j'ai observé sous ce rapport :

Lactate gauche. Zn. Ferment <i>b</i> sucre : glucose.			Lact. gauche. Zn. Ferment <i>p</i> sucre : lactose.			Lactate droit. Zn. Ferment <i>e</i> sucre : saccharose.					
Concentrat.	0/0.	Rot.	P. R.	Concentr.	0/0.	Rot.	P. R.	Conc.	0/0.	Rot.	P. R.
1.720	16'	7°45		2.220	22'	8°15		1.824	23'	10°30'	
3.476	33'	7°54		2.732	27'	8°44		3.988	41'	8°31'	
3.796	38'	8°20		5.528	50'	7°30		4.460	40'	7°45	

La variabilité réelle de toutes les propriétés pouvant servir à reconnaître un lactate oblige donc à y regarder de très près quand on veut préciser la nature du sel obtenu dans une fermentation, et c'est ce que nous devons nous rappeler dans le courant de notre recherche.

Les difficultés augmentent encore par suite de ce fait que si la fermentation lactique ordinaire fournit deux acides isomériques de pouvoir rotatoire opposé, l'un identique avec l'acide gauche de *Tate* et de *Schardinger*, l'autre avec l'acide sarcolacti-

que, il n'est pas assuré que le même microbe donne toujours le même acide avec le même sucre.

C'est ainsi que M. Péré a trouvé que le *B. coli commune* donne avec la dextrose de l'acide dextrogyre, et avec le lévulose de l'acide inactif par compensation : mais, dès qu'on le place dans des conditions défavorables, on a de l'acide droit; il consomme l'acide gauche comme ceci arrive avec beaucoup d'autres végétaux. Il peut se faire qu'il en soit ainsi avec beaucoup d'autres ferments lactiques; ils peuvent ou ne pas produire les deux acides à la fois, ou en détruire l'un plus facilement que l'autre, suivant les conditions de culture.

Ainsi le bacille de Tate donne de l'acide gauche avec la dextrose et la mannite, de l'acide inactif avec la rhamnose; nous allons voir que beaucoup de mes ferments se sont comportés d'une façon analogue. Voici, en effet, le résumé de mes expériences sur ce sujet. Dans chaque ligne horizontale, on trouvera l'indication du microbe, celle du milieu de culture (lait, eau de touraillons (ET) additionnée de divers sucres, moût de bière), le poids humide, le poids sec, et le nombre de molécules d'eau du sel de zinc obtenu au moyen des acides fixes de la fermentation, les nombres relatifs à son pouvoir rotatoire, et la proportion d'oxyde de zinc qu'il contient. Je rappelle que, d'après *Wishcenus*, le pouvoir rotatoire des lactates de zinc est de sens contraire à celui de l'acide générateur.

Ferment.	Sucre.	Poids humide.	Poids sec.	H ₂ O.	Rotation.	P. Rot.	ZnO 0/0.
<i>a</i>	ET. Glucose.....	0.584	0.507	2 ^m .00	21'5 <i>g</i>	8°50'	—
<i>a</i>	M. Bière.....	0.510	0.441	2. 01	21' <i>g</i>	9°45'	—
<i>b</i>	ET. Glucose.....	1.092	0.949	2. 03	38' <i>g</i>	8°20'	33.2
<i>b</i>	ET. Galactose.....	1.468	1.274	2. 04	45' <i>g</i>	7°21'	33.5
<i>b</i>	Lait peptonisé.....	0.582	0.504	2. 08	23' <i>g</i>	9°30'	—
<i>c</i>	ET. Glucose.....	0.677	0.589	2. 00	26' <i>g</i>	9°11'	32.4
<i>c</i>	M. Bière.....	0.444	0.386	2. 03	16' <i>g</i>	8°38'	—
<i>c</i>	Lait peptonisé.....	0.514	0.447	2. 00	20' <i>g</i>	9°49'	33.1
<i>r</i>	ET. Glucose.....	0.465	0.403	2. 05	21' <i>g</i>	10°31'	33.2
<i>r</i>	ET. Saccharose.....	0.465	0.404	2. 00	22' <i>g</i>	11°19'	32.6
<i>r</i>	M. Bière.....	0.158	0.137	2. 00	6' <i>g</i>	9°7'	—
<i>s</i>	ET. Saccharose.....	—	0.380	3. 00	Inactif	—	—
<i>s</i>	ET. Lactose.....	—	0.382	3. 00	»	—	33.5
<i>s</i>	ET. Glucose.....	—	0.630	3. 00	»	—	—
<i>s</i>	ET. Lévulose.....	—	0.329	3. 00	»	—	—

1. E. T. veut dire eau de touraillons; M. Bière, moût de bière.

Ferment.	Sucre.	Poids humide.	Poids sec.	H ₂ O.	Rotation.	P. Rot.	ZnO p/o.
<i>d</i>	ET. Glucose.....	0.168	0.147	2. 00	40' <i>g</i>	14°10'	33.0
<i>d</i>	Lait peptonisé.....	0.252	0.220	2. 00	43' <i>g</i>	12°18'	33.3
<i>d</i>	Mout Bière.....	0.341	0.298	2. 00	44' <i>g</i>	9°47'	32.8
<i>e</i>	ET. Saccharose.....	1.145	0.997	2. 01	44' <i>d</i>	8°31'	33.3
<i>e</i>	ET. Glucose.....	0.624	0.541	2. 06	22' <i>d</i>	8°28'	—
<i>e</i>	Lait peptonisé.....	0.162	0.137	2. 44	11' <i>d</i>	16°43'	—
<i>g</i>	ET. Glucose.....	0.837	0.729	2. 00	31' <i>g</i>	8°52'	33.7
<i>g</i>	ET. Glucose.....	—	0.407	2. 00	18' <i>g</i>	9°12'	33.6
<i>g</i>	M. Bière.....	0.344	0.280	3. 08	Inactif	—	34.2
<i>g</i>	Lait peptonisé.....	0.261	0.226	2. 06	40' <i>g</i>	9°13'	34.0
<i>g</i>	ET. Galactose.....	0.160	0.138	2. 06	7°5 <i>g</i>	11°23'	32.1
<i>h</i>	ET. Glucose.....	0.465	0.404	2. 01	19' <i>d</i>	9°47'	33.3
<i>h</i>	ET. Saccharose.....	0.514	0.445	2. 07	22' <i>d</i>	10°18'	—
<i>h</i>	M. Bière.....	0.579	0.502	2. 07	22' <i>d</i>	9°7'	33.5
<i>h</i>	Lait peptonisé.....	0.207	0.179	2. 08	8' <i>d</i>	9°17'	—
<i>l</i>	ET. Glucose.....	0.416	0.361	2. 03	17' <i>d</i>	9°48'	33.6
<i>l</i>	Lait peptonisé.....	0.431	0.352	3. 03	Inactif	—	33.3
<i>l</i>	Mout de bière.....	—	0.269	2. 09	12' <i>g</i>	9°17'	—
<i>m</i>	M. Bière.....	0.207	0.168	3. 01	Inactif	—	—
<i>m</i>	Lait peptonisé.....	0.211	0.183	2. 04	9' <i>g</i>	10°14'	—
<i>m</i>	ET. Saccharose.....	0.835	0.712	2. 02	24' <i>g</i>	7°1'	—
<i>m</i>	ET. Glucose.....	0.350	0.297	2. 05	41' <i>g</i>	7°43'	34.1
<i>n</i>	ET. Glucose.....	0.198	0.162	3. 00	Inactif	—	34.2
<i>n</i>	ET. Sucre interverti..	0.246	0.213	2. 06	7' <i>g</i>	6°50'	—
<i>n</i>	ET. Empois.....	0.275	0.239	2. 00	13' <i>g</i>	11°20'	34.1
<i>n</i>	ET. Maltose.....	0.196	0.167	2. 04	7' <i>g</i>	8°44'	—
<i>n</i>	M. Bière.....	0.382	0.313	3. 00	Inactif	—	—
<i>n</i>	ET. Léulose.....	0.767	0.661	2. 01	27' <i>g</i>	8°30'	34.0
<i>n</i>	ET. Galactose.....	0.842	0.732	2. 00	23' <i>g</i>	7°6'	34.5
<i>n</i>	ET. Lactose.....	0.361	0.315	2. 00	14' <i>g</i>	9°15'	—
<i>n</i>	ET. Saccharose.....	0.751	0.645	2. 07	20' <i>g</i>	6°27'	33.1
<i>n</i>	ET. Mannite.....	0.316	0.271	2. 07	10' <i>g</i>	7°39'	34.0
<i>o</i>	ET. Saccharose.....	0.142	0.116	3. 00	Inactif	—	32.4
<i>o</i>	ET. Glucose.....	0.265	0.227	2. 04	10' <i>g</i>	9°11'	34.1
<i>o</i>	M. Bière.....	0.432	0.354	3. 00	Inactif	—	31.8
<i>p</i>	ET. Lactose.....	0.792	0.683	2. 02	27' <i>g</i>	8°14'	32.7
<i>p</i>	Lait peptonisé.....	0.537	0.469	2. 00	20' <i>g</i>	8°53'	—
<i>p</i>	ET. Galactose.....	0.137	0.112	3. 00	Inactif	—	—
<i>p</i>	ET. Saccharose.....	0.256	0.210	3. 00	Inactif	—	32.5
<i>p</i>	M. Bière.....	0.607	0.497	3. 00	Inactif	—	33.4
<i>p</i>	ET. Glucose.....	1.031	0.895	2. 00	39' <i>g</i>	9°4'	33.7

On remarquera d'abord que j'ai obtenu des pouvoirs rotatoires variables. Nous savons que la concentration de la liqueur intervient ici; or, pour certains sels, je ne disposais que de faibles quantités; de plus, malgré le grand nombre de lectures faites pour chaque sel, on peut toujours admettre une erreur allant jusqu'à 2 minutes, d'autant plus importante que la rotation était plus faible.

Il est encore probable que j'ai souvent eu affaire à un mélange de deux lactates avec le même microorganisme, dont l'un était représenté par des traces difficiles à éliminer, mais qui ont influencé la rotation; cette hypothèse est d'autant plus facile à admettre que nous savons que l'acide lactique provient de deux sources : la matière azotée et le sucre.

Les nombres obtenus nous renseignent toujours sur la rotation.

Comparons d'abord les différents ferments dans un même milieu. Nous voyons que dans l'eau de touraillons presque tous nos microbes ont donné des sels gauches, c'est-à-dire des acides droits, excepté *e*, *h*, *l* et *n*; il convient de remarquer que le ferment *n* donne de préférence des sels gauches avec le glucose.

Nous voyons que tantôt nous avons des sels gauches, tantôt des sels droits, tantôt des sels inactifs; il en est de même avec tous les milieux examinés.

C'est ainsi qu'avec le moût de bière, nous avons quatre sels gauches, un sel droit et cinq sels inactifs; les sels inactifs ont été obtenus avec les ferments vigoureux qui ont donné le maximum d'acidité fixe dans nos essais. L'influence du ferment est donc manifeste.

Examinons le même ferment dans différents milieux; nous aurons en même temps une idée de la pureté des sels étudiés.

Nous remarquons que les ferments *a*, *b*, *c* et *r* retirés de la crème n'ont donné que des lactates gauches avec les divers milieux employés; nous voyons également par la teneur en ZnO que la plupart des sels étaient pour ainsi dire tout à fait purs et contenaient environ 33,33 0/0 de ZnO.

Les petits écarts constatés sont dus ou à une faible volatilisation de ZnO, ou encore à une trace d'impuretés (acétates, sulfates).

Le ferment *d* donne des sels gauches, le ferment *e* des sels droits et le ferment *s* des sels inactifs; le ferment *g* n'a fourni que des sels gauches et un sel inactif avec le moût de bière.

Le ferment *h* ne donne que des sels droits; le ferment *l* fournit, suivant le milieu, un sel gauche, droit ou inactif; c'est ce qui avait déjà été constaté par M. Péré; aussi l'acide fourni ne peut-il servir de caractère de différenciation, comme le croyait Nencki.

Le ferment *m* donne des sels gauches ou inactifs.

Les ferments *o* et *p* retirés d'une bière belge donnent tantôt des sels gauches, tantôt des sels inactifs comme dans le moût de bière et l'eau de touraillons additionnée de saccharose; mais, chose curieuse, on obtient avec le galactose un sel inactif et avec le lactose un sel gauche.

Nous arrivons enfin au ferment *n*, celui qui a servi au plus grand nombre d'expériences; nous remarquons qu'il donne des sels gauches avec tous les sucres, excepté avec le moût de bière; l'eau de touraillons glucosée n'a donné qu'une seule fois un sel inactif et c'était avec le ferment *n*; mais on obtient ordinairement avec ce ferment et le glucose un sel gauche.

Il faut encore signaler que le moût de bière de brasserie a donné un sel inactif, tandis que dans une solution de maltose additionnée de peptone, le sel obtenu tournait à gauche. Est-ce l'action de la peptone qui se fait ici sentir? On serait tenté de le croire, en se rapportant aux expériences que nous allons discuter plus loin.

Il importe encore d'examiner deux autres nombres relatifs aux lactates obtenus avec le sucre interverti et le saccharose pour le ferment *n*; les pouvoirs rotatoires sont bien plus faibles, bien que les poids essayés ne fussent pas très faibles.

Nous savons que la peptone intervient directement dans la formation de l'acidité fixe, que de plus les ferments lactiques sont très friands de peptone; il est dès lors très difficile de faire la part respective de la matière azotée et des sucres plus difficiles à attaquer.

Je crois néanmoins pouvoir affirmer que le ferment *n*, le seul essayé sous ce rapport, jouit de la faculté de donner de l'acide lactique avec les sucres : xylose, mélézitose, tréhalose, arabinose, galactose, raffinose, sucres que je dois à l'extrême obligeance de MM. Bertrand, Fernbach, Lindet et Maquenne; les quantités de sels obtenus avec ces sucres étaient proportionnellement bien plus grandes que celles obtenues avec la peptone seule; il n'y a aucun doute à avoir pour le galactose et l'arabinose.

Je me contenterai de citer l'expérience suivante :

Ferment n.

Eau de Seine + 0.5 0/0 de peptone Chapoteaut + 3 0/0 des sucres purs.

	Poids sec.	Rotation.	Pouv. Rot.
Arabinose	0.326	10'g	6°23'
Galactose	0.358	11'g	4°6'
Galactose	0.901	18'g	4°9'
Raffinose	0.271	13'g	9°39'
Mannite	0.286	12'g	9°4'
Peptone seule	0.378	10'g	5°30'

Il se peut que lorsque le sucre est difficile à attaquer, le ferment s'attaque de préférence à la matière azotée qui intervient ainsi dans la rotation du sel.

Le tableau suivant nous donnera une récapitulation générale du sens de la rotation des lactates de zinc avec les différents sucres et pour les différents ferments.

SUCRE	MILIEU	a	b	r	c	d	e	s	g	h	l	m	n	o	p
$C^5H^{10}O^5$															
Arabinose	Eau de Seine peptonisée.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
Xylose...	—	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
$C^6H^{14}O^6$															
Mannite..	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
$C^6H^{12}O^6$															
Glucose..	—	g	g	g	g	g	d	ln	g	d	d	g	ln g	g	g
Lévulose..	—	»	»	g	»	»	»	ln	»	»	»	»	g	»	»
Galactose	—	»	g	»	»	»	»	»	g	»	»	»	g	»	ln
$C^{12}H^{22}O^{11}$															
Maltose..	Mout de bière.	g	»	g	g	g	»	»	ln	d	g	ln	ln	ln	ln
—	Eau peptonisée.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
Lactose..	Lait peptonisé.	»	g	»	g	g	d	»	g	d	ln	g	»	»	g
—	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	ln	»	»	»	g	»	»	g
Saccharose	—	»	»	g	»	»	d	ln	»	d	»	g	g	ln	ln
Melézitose	Eau peptonisée.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	g	»	»
Tréhalose	—	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	g	»	»
$C^8H^{10}O^5$															
Amidon..	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	g	»	»

Nous voyons qu'il n'existe aucune relation entre le sucre générateur et l'acide produit; tel ferment donne avec tous les sucres des acides droits, tel autre des acides gauches, tel autre des acides inactifs; enfin il y en a qui peuvent donner divers acides suivant le milieu dans lequel ils sont ensemencés.

Il y a des ferments qui donnent de l'acide lactique d'un pouvoir rotatoire opposé avec des sucres possédant le même poids moléculaire, tout à fait comme nous avons trouvé que le même poids de sucre détruit ne donne pas toujours le même poids d'acide lactique, l'acidité volatile variant essentiellement avec le mode de culture, la richesse du milieu et le ferment producteur.

Obtient-on le même acide au début et à la fin d'une même fermentation; ceci semble être le cas d'après l'expérience suivante.

De l'eau de touraillons avec 40,60 0/00 d'extrait et 35,61 0/00 de glucose a été ensemencée avec le ferment *n*; j'ai préparé les sels de zinc avec la prise faite au bout de 10 jours et le restant du liquide analysé après 25 jours : voici les résultats :

	Acidité totale 0/00.	Poids hum.	Poids sec.	Rotat.	P. Rotat.
Après 10 jours.	4.42	0.430	0.370	15'g	8°26'
— 25 —	6.48	1.451	1.254	41'g	6°48'

Obtient-on le même acide lactique par la culture en surface et en profondeur?

Eau de touraillons glucosée (traces de peptone), ferment n.

	Poids hum.	Poids sec.	Rotat.	P. Rotat.	Zn 00/0.
Profondeur...	1.070	0.869	23'g	5°30'	33.8
Surface	0.816	0.710	29'g	8°21'	33.5

Si nous mettons les pouvoirs rotatoires en rapport avec la proportion d'eau, nous trouvons que, dans la culture en profondeur, cette teneur se rapproche davantage de celle des sels inactifs; aussi est-on tenté d'admettre que, dans la culture en profondeur, on obtient un mélange d'acides actif et inactif, et que c'est le sel inactif qui fait baisser le pouvoir rotatoire.

Il reste un dernier point à examiner. Nous avons parlé à diverses reprises, dans le courant de ce travail, de combustions aérobies. Ont-elles porté sur le sucre, ou le ferment lactique est-

il capable, comme le ferment acétique, de brûler l'acide qu'il a formé? Dans ce cas, tient-il compte, comme d'autres microbes, du pouvoir rotatoire, et, dans l'acide lactique inactif, brûle-t-il de préférence un des constituants.

Un premier essai que j'ai fait avec une solution de lactate de chaux du commerce, à raison de 2 0/0 et additionné de traces de bouillon Liebig, n'a donné que des résultats négatifs.

Il en était encore de même d'un 2^e essai avec du lait peptonisé et débarrassé du sucre de lait par une levure de lactose.

Enfin, dans un troisième essai, l'attaque, quoique très faible, semble être très nette.

Je dissous dans 400 c. c. cinq grammes de lactate de chaux inactif, obtenu par la culture du ferment *n vieux* dans le moût de bière; j'ajoute 2 grammes de peptone Chapoteaut, et ce liquide est partagé en quatre parts que j'ensemence avec les ferments *n vieux*, c'est-à-dire conservé 6 mois dans du jus d'oignons sans craie, *n rajeuni*, *b* et *h*.

Voici les changements observés déjà au bout de quelques jours :

<i>n vieux</i> ...	Liquide reste jaune citron.
<i>b</i> —	— —
<i>n jeune</i> ...	Liquide devient brunâtre.
<i>h</i> —	— —

Au bout de 5 semaines, je ramène tous les liquides au volume initial, excepté le liquide *h* qui est ramené au double.

L'examen microscopique montre que les deux ferments *h* et *n rajeuni* se sont bien développés, la réaction est alcaline.

Ces liquides étant trop foncés, je suis obligé de les décolorer par du noir animal pour faire l'observation polarimétrique.

Voici la rotation observée dans le tube de 20 c. c.

<i>n vieux</i> ...	à gauche 30 minutes.
<i>b</i> —	— 24 —
<i>h</i> —	Inactif ou à droite 4 —
<i>n rajeuni</i> ...	à gauche 4 —

Il faut en conclure que le lactate inactif a été attaqué par les ferments *h* et *n jeune*.

Dans ces deux matras, il existait au fond un dépôt très-collant ;

une trace, examinée au microscope, a montré des ferments lactiques et une matière inerte ne ressemblant nullement au lactate de chaux primitif et faisant effervescence avec de l'acide chlorhydrique dilué; c'était du carbonate de chaux.

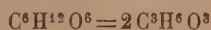
Je dissous les deux résidus par de l'acide chlorhydrique dilué, je chasse l'acide, je reprends par un peu d'eau et je précipite la chaux à l'état d'oxalate; je dois ajouter que j'avais perdu un peu de résidu par la première filtration des liquides.

Je trouve ainsi pour n rajeuni		0.037 CO^3Ca .
h		0.029 —
Ce qui correspond pour n	à...	0.081 $(\text{C}^3\text{H}^5\text{O}^3)^2\text{Ca}$.
h		0.063 —

La combustion n'est donc pas douteuse.

EXISTE-T-IL UNE DIASTASE LACTIQUE?

Tout ce que nous venons de voir nous montre que le phénomène de la fermentation lactique est loin d'avoir la simplicité qui correspond à l'équation classique :



Mais comme cette équation correspond à un dédoublement, divers savants, tels que *Hoppe-Seyler* en 1859, *Billroth* en 1877, se sont demandé s'il n'y avait pas là une simple action de diastase, analogue à celle qui dédouble le saccharose. Rien ne dit, *a priori*, que ce soit impossible. Le dédoublement d'une molécule de sucre en deux d'acide lactique dégage de la chaleur, et si la fermentation lactique ne le réalise pas, rien ne dit qu'elle ne soit la superposition d'un dédoublement diastasique et d'une action de ferment sur les produits formés.

Ce que nous venons de voir au sujet de la difficulté de la combustion des lactates par les ferments lactiques n'est pas favorable à cette manière de voir. Mais il vaut mieux consulter à ce sujet l'expérience.

Celles que j'ai faites pour montrer l'existence d'une diastase m'ont toutes donné des résultats négatifs.

Première expérience. — Du moût de bière estensemencé avec

plusieurs ferments lactiques; la fermentation dure un mois; je fais passer le liquide fermenté à travers une bougie Chamberland dans un vase stérile, 20 c. c. de ce liquide sont ajoutés à 50 c. c. d'une solution stérile de maltose neutre et à 50 c. c. de la même solution acide; d'autre part le résidu microbien est broyé, dans un mortier stérilisé, avec de l'eau; je fais également passer ce liquide à travers la bougie Chamberland, et agir aux mêmes doses sur les mêmes solutions de maltose stériles.

Après 15 jours de macération à la température de 28°, je ne constate nulle part la moindre augmentation dans l'acidité.

Deuxième expérience. — Une solution de lactose avec des traces de peptone et de lait peptonisé estensemencée avec les ferments *c, e, m, n* et *p*.

Après 8 jours de fermentation je filtre le liquide à travers une bougie Chamberland et je recueille environ 50 c. c. dans des vases coniques flambés.

Je pèse les matras et je dose l'acidité des différents liquides.

Pour chaque ferment j'ai quatre vases coniques; deux sont abandonnés à eux-mêmes après la pesée; les deux autres sont pesés et portés pendant une demi-heure à 100°, puis placés à l'étuve à côté des deux premiers.

Au bout de 15 jours, je dose l'acidité à l'aide de la même eau de chaux et du même papier de tournesol.

Les liquides sont d'abord ramenés au poids primitif, bien agités et titrés; l'observation microscopique n'a révélé la présence d'aucun bacille, les liquides étaient restés tout à fait clairs, et on n'a constaté aucune différence d'acidité entre les matras chauffés et non chauffés. La dose d'acide aurait dû augmenter dans ces derniers, si les 8 jours de culture y avaient déposé une diastase lactique.

A ces essais on peut faire deux objections: la première, c'est que la diastase lactique a pu être arrêtée par la bougie; la seconde, c'est qu'elle a pu être retenue dans les tissus du microbe.

Nous savons que les tissus microbiens mis en macération avec de l'eau distillée cèdent parfois facilement leurs diastases, telle la sucrase. Aussi fallait-il faire une expérience dans ce sens.

Troisième expérience. — Je laisse fermenter pendant deux mois du moût de bière avec les ferments *b*, *n* et *o*: le moût était contenu dans de grands ballons Pasteur à deux tubulures.

Je remplace alors le moût par de l'eau distillée stérile, en présence d'un peu d'essence de moutarde.

Je laisse macérer pendant 10 jours, je décante le liquide dans des vases flambés, et, à l'aide de pipettes flambées, je prélève un certain volume de ce liquide que je fais agir sur une solution stérile de lactose à 20/00, contenue dans des vases coniques.

Tous les matras sont pesés avant et après l'addition du liquide diastasifère; ils sont ramenés au même poids à la fin de l'expérience, c'est-à-dire au bout de dix jours.

Tous les matras étaient en double; ils ont été divisés en trois groupes :

1^{er} groupe. — 50 c. c. de solution de lactose, plus 10 c. c. de liquide diastasifère.

2^e groupe. — 50 c. c. du mélange des deux liquides et passés à la bougie Chamberland.

3^e groupe. — 50 c. c. de la solution de lactose, plus 10 c. c. du liquide diastasifère, portés à 60° pendant une demi-heure.

Dans aucun ballon, je n'observe une augmentation d'acidité.

Quatrième expérience. — Les ferments *m* et *n* ont été traités comme dans l'expérience III, le moût de bière est remplacé par du jus d'oignons; je ne constate aucune augmentation de l'acidité originäre.

Il semble donc qu'on peut conclure à l'absence d'une diastase lactique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail, j'ai montré l'origine des ferments lactiques, leur morphologie, leurs fonctions physiologiques, leurs caractères distinctifs dans divers milieux.

J'ai indiqué les méthodes de culture employées.

Je dois surtout signaler ici les différences constatées dans leur résistance à la chaleur en milieu liquide, le temps qu'il leur faut pour cailler le même lait à diverses températures, l'acidité produite dans divers milieux, leur résistance à la dessiccation.

Dans la *deuxième* partie j'ai étudié :

A. — *La réaction du milieu.*

J'ai montré :

1° Que l'acidité totale, fixe et volatile, dépendaient du microbe ensemencé ;

2° Que l'acidité était beaucoup plus élevée en milieu neutre ;

3° Que pour un même microbe l'acidité dépendait essentiellement du milieu et du mode de culture.

B. — *Influence de la durée de la fermentation.*

1° L'acidité totale augmente continuellement chez certains ferments ; chez d'autres elle décroît à un moment donné pour ensuite augmenter ou osciller autour d'une certaine limite ;

2° L'acidité volatile varie dans le même sens ; elle est surtout formée d'acide acétique ;

3° Chez certains ferments l'acidité totale augmente, mais l'acidité fixe diminue continuellement, et il ne reste finalement que de l'acide acétique ;

4° A partir d'un certain jour, variable avec le ferment et le milieu de culture, la quantité totale d'acide produite par jour décroît régulièrement.

C. — *Influence de l'âge.*

1° L'âge du ferment a une grande influence sur la marche de la fermentation ;

2° Les ferments ensemencés en milieux neutres conservent longtemps leurs premières propriétés ; mais ils dégénèrent par culture sur milieux solides ou en milieux acides ;

3° Les ferments d'un mois sont plus vigoureux que les ferments tout jeunes ; à partir de ce moment ils perdent plus ou moins rapidement leur virulence, suivant le milieu dans lequel on les ensemence ; c'est ainsi qu'ils dégénèrent plus vite dans le jus d'oignons sans craie que dans l'eau de navets sans craie.

D. — *Influence de l'air.*

Il y a des ferments lactiques aérobies, anaérobies et des ferments indifférents.

E. — *Influence de la culture en surface et en profondeur.*

1° La culture en surface donne surtout lieu à de l'acide volatil (acide acétique) ;

2° L'acidité fixe peut être très élevée dans les cultures en profondeur et atteindre 85, 90, 95 0/0 du sucre disparu, tandis qu'elle est, en général, beaucoup plus faible dans la culture en surface ;

3° Le ferment mis en jeu joue dans ces différents modes de culture un très grand rôle.

F. — *Influence de la matière azotée.*

1° Les ferments lactiques préfèrent la peptone à toutes les autres matières azotées ;

2° L'acidité fixe augmente proportionnellement, jusqu'à une certaine limite, avec la richesse du milieu en peptone ; les différences sont d'autant plus sensibles que le ferment est plus exigeant ;

3° L'acidité volatile ne dépend que peu de la richesse du milieu en matière azotée ;

4° Les ferments lactiques donnent de l'acide lactique avec de la matière azotée pure ;

5° Le rapport entre la quantité en poids du ferment et la quantité de sucre disparu peut être très élevé ;

6° Le même poids de ferment transforme en acide fixe plus de sucre par la culture en profondeur que par la culture en surface ;

7° Les ferments lactiques peuvent atteindre une forte teneur en azote, de façon à ressembler à de la matière albuminoïde pure (15 0/0 d'azote) ;

8° La richesse en azote des ferments lactiques est proportionnelle à la richesse en azote du milieu ;

9° Le ferment cultivé en profondeur est moins riche en azote que s'il est cultivé en surface, toutes choses égales d'ailleurs ;

10° Le ferment cesse de se multiplier à partir d'un certain moment ; sa richesse en azote augmente avec la durée de la fermentation.

G. — *Influence de la richesse saccharine.*

1° L'addition de sucre à un milieu de culture agit moins activement que l'addition de peptone ;

2° Chaque ferment semble préférer certains sucres à d'autres.

H. — Sels.

3° Un même ferment peut donner divers acides avec un même sucre ;

4° Il y a des ferments qui donnent avec différents sucres le même acide (gauche, droit ou inactif) ;

5° Un même ferment peut donner lieu à divers acides lactiques ;

6° Les sucres en C⁶ semblent attaquables par des ferments lactiques vigoureux ;

7° L'âge de la semence et les cultures successives dans différents milieux peuvent avoir une influence sur l'acide produit ;

8° Le même ferment donne le même acide, qu'il soit cultivé en surface ou en profondeur ;

9° Il y a des ferments lactiques qui paraissent attaquer le lactate de chaux inactif.

I. — Diastase.

Il ne semble pas exister de diastase lactique.

En résumé, la fermentation lactique est influencée par un grand nombre de facteurs et est sujette à des variations multiples.

Les cellules semblent passer par un maximum d'activité, dépendant du ferment considéré et des conditions alimentaires ; aussi est-il très difficile d'établir l'équation exacte de cette fermentation ; tout au plus la superposition de diverses équations en rapport avec le moment de la fermentation pourrait-elle permettre de nous faire une idée approchée du phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

- BAGINSKY (A.). Zur biologie der normalen Milchkothbacterien. — *Zeitschrift fur phys. Chemie*, Bd. XII, p. 443-462.
- BERTHELOT, *Ann. de chimie et de physique*, 3^e série II., p. 322.
- BERZÉLIUS. Über die Milchsäure. — *Ann. der phys. und chemie* XIX, 1830, p. 26.
- BEYERINCK, *Bot. Zeitung*, 1891, n° 46.
- BEYERINCK. *Centralblatt fur Bacteriologie und Parasitenkunde*, 1889, v. II, p. 44.
- BOURQUELOT (EM.) Les microbes de la fermentation lactique du lait. — *Journ. de pharmacie et de chimie*, 1886, XIII, p. 195.
- BOUTRON ET FRÉMY. Recherches sur la fermentation lactique. — *Ann. de chimie et de phys.*, II, 1840, p. 271.
- BOUTROUX, Sur la fermentation lactique. — *C. R.* LXXXVI, p. 605, 1878.
- BRACONNOT, Sur un acide particulier qui se développe dans les matières acescentes. — *Ann. de chimie*, LXXXVI, 1813, p. 84.
- DELACROIX (E.), Fabrication von Milchsäure aus dem Milchserum. — *Journ. f. pharm. und chemie*, 5, t. XXIII, 1891, p. 287.
- DUCLAUX (E.), *Annales de chimie et de physique*, 6^e série, t. VIII, 542.
- DUCLAUX (E.), Recherches sur les vins. — *Ann. de chimie et de physique*, 5^e série, t. III, 1874.
- FERNBACH (A.), Etude sur la sucrase. — *Thèse de la Faculté des sciences de Paris*, 1890.
- FOKKER (A. P.), Über bacterienvernichtende Eigenschaften der Milch. — *Zeitschrift fur Hygiene*, Bd. IX, 1890, p. 41.
- FOKKER (A. P.), Onderzoekingen omtrent Melkzuurgisting. — *Ned Tydschr. v. Geneesk*, 1890, p. 88.
- FOKKER (A. P.), Über das Milchsäureferment. — (*Centralblatt fur Bacteriologie und Parasitenkunde*, VI, Band., p. 472, 1889.
- PERCY FRANKLAND and J. MAC GREGOR, Sarcolactic acid obtained by the fermentation of inactive lactic acid. — *Trans. of the chem. society*, 1893.
- GRIMBERT, Fermentation par le bacille orthobutylicus. — (*Thèse de la Faculté des sciences de Paris*, 1893.)
- GROTEFELT (G.), Studien über die Virulenz einiger Milchsäurebacterien. — *Fortschritte der medecin.*, LL., 1889.
- HAYDUCK, Über Milchsäuregährung. *Wochenschrift fur Brauerei*, n° 17, Berlin, 1887.
- HUEPPE (F.), Untersuchungen über die Zersetzung der Milch durch Microorganismen. — *Mittheilungen aus dem Kaisert. Reichsgesundheitsamte*, II, 1884, p. 309.
- JACQUEMIN (G.), Fabrication industrielle de l'acide lactique. — *Bull. soc. chim.*, Paris, t. V, 1891.
- KABRHEL (G.), Über das Ferment der Milchsäuregährung in der Milch. — *Allgemeine Wiener med. Zeitung*, n° 52 et 53, 1889.
- LIEBIG (J.), Über die Ursachen des raschen Gerinnens der Milch bei Gewitter und die Mittel dasselbe zu verhindern. — *Dissertation Heidelberg*, 1891.
- LINDNER (P.), Über ein neues, in Malzmaische vorkommendes Milchsäure bildendes Ferment. *Wochenschrift fur Brauerei*, n° 23, 1887.
- LINOSSIER (G.), Sur le dédoublement de l'acide lactique inactif par les moisissures. — *Bull. soc. chim. Paris*, t. V, p. 10.
- LISTER, On the lactic fermentation and its bearing on pathology. — *Trans. of the pathological society of London*, vol. 29, 1878.
- LUBOLT, *Journal fur prakt. Chemie.*, t. LXXVII, p. 282.

MALY, Über die Entstehung der Fleischmilchsäure durch Gährung. — *Berichte der chem. Gesellschaft*, VII, 1874-1868.

MALY, Untersuchungen über die Quelle der Magensaftsäure. — *Liebigs Ann. der Chemie*, V, 173, 1874, p. 227.

MAYER HERM. Über das Milchsäureferment und sein Verhalten gegen Antiseptica. — *Dorpat*, 1888.

MAYER (A.), Studien über die Milchsäuregährung. — *Zeitschrift für Spiritusindustrie*, 1891, n° 25 à 27.

NENCKI (M.), Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einiger Spaltpilzarten. — *Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde*, IX B., 1891.

NENCKI ET SIEBER, Über die Bildung der Paramilchsäure durch Gährung des Zuckers. — *Sitzungsberichte der kaiserl. Academie der Wissenschaften in Wien*, mai 1889, Bd., XCVIII.

OPPENHEIMER, Biologie der Milchkothbakterien des Säuglings. — *Cf. Bact.*, p. 586, vol. II, 1889.

PASTEUR, Mémoire sur la fermentation appelée lactique. — *Ann. de chimie et de physique*, 3^e série, t. LII, p. 404.

PÉLOUZE ET GÉLIS, Fermentation lactique. — *Ann. de chimie et de physique*, 3^e série, t. X, 1844.

PÉRÉ, Contribution à la biologie du bact. coli commune et du bacille typhique. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, p. 512.

PÉRÉ, Formation des acides lactiques isomériques. — *Ann. Inst. Pasteur*, 25 nov. 1893, p. 737.

PIROTTA (R.) ET RIBONI (G.), Studii sul latte *Milano*, 1879.

PURDIE (R.) ET WALKER (W.), Resolution of lactic acid into its optically active compounds. — *Journal of the chem. society*, 16 juin 1892, n° 59.

REMAK, *Canstads Jahresbericht*, t. I, p. 7, 1841.

RICHT (CH.), De la fermentation lactique du sucre de lait. — *C. R.*, LXXXVI, 1878, p. 550.

De quelques conditions de la fermentation lactique. — *C. R.*, LXXXVIII, 1879, p. 750.

De l'action de quelques sels métalliques sur la fermentation lactique. — *C. R.*, t. CXIV, 1892, p. 1494.

SCHARDINGER, Über ein neue, optisch active, Modification der Milchsäure durch bacterielle Spaltung des Rohrzuckers erhalten. — *Monatshefte für Chemie*, Bd. XI, 1890, p. 545.

SCHÉELE, *Sämmtliche Werke*, t. II, p. 249, 1793.

SCHOLL (H.), Über Milchsäuregährung. — *Fortschritte der Medicin*, n° 2, 1890.

STORCH (V.), Nogle Undersgelser over Flodens Syrning. — *Kjöbenhavn Trykt hos Nielsen and Lydiche*, 1893.

TATE (G.), Über Gährungsversuche mit einem Linksmilchsäure producirenden ferment. — *Journ. of the chem. society*, 1893, p. 1263.

TIMPE (H.), *Landwirthschaftliche Versuchsstationen*, Bd. XLIII, p. 223.

WEIGMANN, Sur Säurung des Rahmes mittels Bacterienreinculturen. — *Land. Woch. für Schleswig-Holstein*, n° 29, 1890.

Neue Mittheilungen über Rahmsäuerung mittels Reinculturen von Säurebakterien. — *Milchzeitung*, Bd. XIX, p. 944-1890.

Erfahrungen über die Rahmsäuerung mit Reinculturen. — *Land. Woch. für Schleswig-Holstein*, n° 16, 1892.

WISLIZENUS, Die isomeren Milchsäuren. — *Annalen der Chemie und Pharmacie*, neue Reihe, Bd. XCI, 1873, p. 302, et Bd. CLXVI, 1873, p. 6.

ACTION DE CERTAINES SUBSTANCES ANTISEPTIQUES SUR LA LEVURE

PAR M. HAROLD H. MANN

(Travail du laboratoire de chimie biologique à l'Institut Pasteur.)

Parmi les notions complexes que soulève l'étude des antiseptiques, une des moins connues jusqu'ici est celle sur laquelle M. Duclaux a appelé l'attention, celle du rapport qui doit exister entre la quantité de la substance antiseptique et celle du nombre des cellules vivantes exposées à subir son action. Le chloroforme, par exemple, arrête une fermentation où n'interviennent, pour une raison quelconque, qu'un petit nombre de cellules de levure ; il est sans action sensible sur une fermentation bien en train. et, à la condition de mettre assez de levure, on peut faire fermenter de l'eau sucrée reposant sur une couche de chloroforme.

Tous les antiseptiques se comportent-ils de la même façon ? Dans quelle mesure le pouvoir antiseptique d'une substance dépend-il du nombre de cellules sur lesquelles il peut agir ? Peut-on augmenter indéfiniment le nombre de ces cellules sans augmenter en même temps la quantité d'antiseptique, ou bien le degré de concentration de l'antiseptique doit-il marcher de pair avec le degré d'agglomération des cellules vivantes, avec la densité de la population ? Telles sont quelques-unes des questions que je me suis proposé d'examiner, sur le conseil de M. Duclaux, en prenant la levure de bière comme sujet d'expérience. Je n'ai étudié aussi que quelques antiseptiques, et je déclare tout de suite que les conclusions de mon travail ne s'appliquent qu'à l'être vivant et aux substances mises en œuvre. La levure dont je me suis servi était tantôt une culture pure de *saccharomyces cerevisiae*, tantôt de la levure du commerce, lorsqu'il en fallait de grandes quantités.

L'important est le choix d'une méthode. Il y en a plusieurs

qui viennent à l'esprit et qui ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. Celle dont je me suis servi tout d'abord consiste à mettre dans une quantité connue de liquide nutritif une dose d'antiseptique, suffisante pour gêner, sans l'arrêter, le développement de la levure. On sème dans ce milieu de composition constante des cellules en nombre différent, qu'on laisse se multiplier pendant le même temps dans les mêmes conditions. Si l'effet de l'antiseptique est indépendant du nombre des cellules, elles auront été toutes également retardées, et, après développement, leurs nombres resteront proportionnels à ce qu'ils étaient avant. Si au contraire l'action antiseptique augmente à mesure que diminue le nombre de cellules, comme le serait l'effet d'un poison qu'un plus petit nombre d'êtres vivants auraient à se partager, le développement sera plus lent dans les matras les moins chargés de globules, et les nombres proportionnels seront plus grands après culture, quand on passera des matras originairement pauvres aux matras originairement riches.

Tout revient donc à une numération de cellules qu'on peut faire soit par les compte-globules ordinaires, soit par la méthode des colonies sur gélatine. Une condition importante que nous avons laissée en apparence de côté, dans le raisonnement, intervient pour décider du choix. Il faut, pour que la méthode soit bonne, que le nombre des cellules présentes dans le matras le plus chargé ne soit pas tel qu'elles se gênent les unes les autres, et qu'elles ne soient pas, pour ainsi dire, les unes pour les autres, un antiseptique nouveau dont les effets se superposent à l'effet à étudier; c'est à une expérience à blanc à indiquer ces chiffres maxima, qui varieront du reste suivant qu'on fera plus ou moins varier le temps laissé à la multiplication. Or, quand on fait cette expérience, on voit que le nombre des cellules à introduire dans chaque essai, pour qu'elles ne se gênent pas après multiplication, est tellement faible qu'elles échappent au début à toute numération précise par le compte-globules: il faut avoir recours à la méthode des cultures.

Je me servais d'une gelée formée de 200 grammes de gélatine, 40 grammes de touraillons, bouillis dans un litre d'eau et filtrés, et de 100 grammes de sucre interverti par un peu d'acide qu'on neutralisait ensuite. On faisait avec tout cela un volume de 2 litres. Les cellules de levure poussent bien à la surface et dans les profon-

dours de cette gelée, et on peut compter avec sécurité des nombres de cellules cent fois plus petits qu'avec la méthode précédente.

Voici les résultats de quelques expériences à blanc, c'est-à-dire sans addition d'antiseptique. La colonne A donne les nombres proportionnels de cellules de levure introduite au début. Ces nombres n'ont pas été déterminés en unités dans les deux premiers essais, ils étaient de 13, 26 et 104 dans le troisième essai. Partout ils ont été très faibles.

La colonne B donne, en heures, le temps laissé à la culture. La colonne C donne le nombre de colonies, égal au nombre de cellules après culture. La colonne D indique ce qu'il aurait dû être dans le cas où chacun des globules aurait poussé librement, sans être gêné par ses voisins.

	A	B	C	D.
I	1	3 h. 30	14	12
	2	»	24	24
	4	»	48	48
II	1	6 h. »	19	19
	2	»	44	38
	3	»	56	57
III	1 (13)	17 h. 30	23.5	21.5
	2 (26)	»	46.5	43
	8 (104)	»	171.5	172

On voit que les nombres, après culture, sont exactement dans le même rapport qu'avant. La méthode, dans ces limites, peut donc servir à apprécier les effets d'un antiseptique, et nous allons nous en servir tout à l'heure.

Je veux auparavant en signaler une autre qui revient au même, mais par une voie en apparence tout autre. Imaginons que nous introduisions des nombres différents de cellules dans des quantités égales d'une solution antiseptique dont la force est insuffisante à les tuer toutes; y aura-t-il la même quantité de cellules détruites, lorsqu'on en ajoutera peu que lorsqu'on en ajoutera beaucoup? Cela revient encore à viser le partage du poison entre les globules présents. Quelques-uns le prendront-ils tout, ou se partage-t-il entre tous? Dans le premier cas, les chiffres proportionnels, après l'action de l'antiseptique, seront supérieurs à ce qu'ils étaient à l'origine, puisque dans les matras

les moins chargés, la dépopulation par l'antiseptique aura été proportionnellement plus considérable que dans les autres. Dans le second, il n'y aura qu'un retard général, mais les nombres resteront proportionnels. En faisant varier le temps du contact avec le milieu antiseptique, on peut voir si la durée d'action change quelque chose aux premiers résultats.

Les cellules sortant du milieu antiseptique étaient lavées dans un liquide nutritif avant d'être ensemencés dans la gélatine.

ACIDE PHÉNIQUE

Étudié par les deux méthodes qui précèdent, l'acide phénique ne témoigne d'aucune influence du nombre de globules présents sur la puissance d'action de l'antiseptique. Voici en effet 4 expériences faites par la première méthode, résumées dans un tableau de même construction que celui qui précède, et on voit que la multiplication s'est faite à peu près suivant les mêmes lois que s'il n'y avait pas eu d'antiseptique.

A	B	C	D	Ac. phén. 0/0
1	2 h.	32	32	0,013
2	»	62	64	»
4	»	128	128	»
1 (2345)	3 h. 30'	45	47,2	0,053
2 (4630)	»	36	34,5	»
4 (9260)	»	69	69	»
1 (492)	16 h. 30'	22	19,5	0,050
2 (384)	»	39	39	»
1 (532)	17 h. 30'	48,5	23,4	0,039
2 (1064)	»	43,5	46,7	»
4 (2128)	»	93,5	93,5	»

L'action de l'acide phénique sur les globules de levure ne semble donc pas être une action *individuelle*, je veux dire une action portant sur l'individu : c'est une action de milieu, que l'antiseptique rend plus ou moins favorable à la vie des cellules et dont celles-ci éprouvent de la même façon l'influence. C'est ce qui résulte encore du tableau suivant, qui donne les nombres trouvés dans deux expériences faites par la seconde méthode. En présence d'une même dose assez forte d'antiseptique, 0,055 0, 0

d'acide phénique, on avait mis des quantités de cellules représentées par les nombres des colonnes 2 et 3. Au bout de temps divers, on comptait, par la méthode des colonies, les nombres de cellules restant. On voit que le rapport de ces nombres demeure à peu près constant, et égal à ce qu'il était à l'origine.

1	2	3	4
Temps d'action.	N. de cellules (a).	N. de cellules (b).	Rapport
—	—	—	—
5 min.	97	230	2,4
10 min.	86	220	2,56
15 min.	74	182	2,46
6 min.	208	450	2,16
11 min.	198	426	2,15

Le nombre des cellules qui dans chacun des essais périssent ou deviennent incapables de se développer, reste donc à peu près proportionnel au nombre de cellules vivantes. L'action apparaît donc comme une action générale, indépendante de toute sélection.

SULFATE DE CUIVRE

Après le phénol, j'ai étudié les sels de métaux lourds possédant des propriétés antiseptiques. Voyons d'abord ce qui est relatif au sulfate de cuivre.

Le tableau suivant donne les résultats de quelques expériences faites avec ce sel, en employant la première méthode. La colonne A donne comme tout à l'heure les nombres proportionnels, et entre parenthèses, les nombres unitaires de globules mis en œuvre; la colonne B le temps de l'action; la colonne C le nombre de cellules trouvées dans chacun des matras additionnés des quantités indiquées de $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$. On a mis entre parenthèses le nombre de cellules du témoin, c'est-à-dire du matras ayant reçu à l'origine la même quantité de globules que le matras le moins chargé de la série, mais sans addition d'antiseptique. Enfin la colonne D donne les nombres proportionnels après culture, en prenant comme unité le nombre des cellules dans le matras qui en a le moins.

A	B	C	D	Cu SO ⁴ /0.
I 1	48 h. 30'	8 (T. 13)	4	0,04
2	»	46	2	»
4	»	41	5,1	»
II 1 (362)	48 h.	178,5 (T. 230)	4	0,05
2 (724)	»	438,5	2,46	»
4 (1448)	»	804,5	4,52	»
III 1 (203)	48 h. 30'	260 (T. 405)	4	0,016
2 (406)	»	569	2,19	»
4 (812)	»	1160,5	4,46	»
IV 1 (35)	21 h. 45'	355 (T. 586)	4	0,016
2 (70)	»	761	2,14	»
4 (140)	»	1344	3,8	»
V 1 (35)	21 h.	237 (T. 330)	4	0,013
2 (70)	»	565,5	2,38	»
4 (140)	»	1265,5	5,33	»

On voit que partout, sauf dans un matras de la quatrième expérience, les nombres proportionnels croissent plus vite après qu'avant culture en présence de l'antiseptique, ce qui témoigne, comme nous l'avons vu, que l'action d'une même proportion d'antiseptique est plus puissante lorsque le nombre des cellules est moins grand. On retrouve le même effet dans l'expérience suivante faite par la seconde méthode, et résumée comme nous l'avons fait pour l'acide phénique. La solution contenait environ 0,2 0/0 de sulfate de cuivre cristallisé.

1	2	3	4
Temps d'action.	N. de cellules (a).	N. de cellules (b).	Rapport $\frac{a}{b}$
10" et 10'45"	425	935,5	2,2
20'15" et 20'	381,5	886,5	2,32
30'30" et 31'15"	264	487,5	2,41

L'augmentation avec le temps du rapport $\frac{a}{b}$ témoigne qu'il y a plus de cellules rendues inactives, proportionnellement, là où il y en a eu le moins d'ajoutées. Lorsque la quantité de levure augmente, l'effet d'une même solution de sulfate de cuivre est donc *moindre* qu'avec une quantité plus faible. De quoi cet effet dépend-il ? L'hypothèse la plus simple est évidemment que les cellules se teignent ou s'imprègnent de sulfate de cuivre à la façon des laines dans un bain colorant, de sorte qu'il y en a d'autant

plus pour chacune qu'elles sont moins nombreuses. Et cette hypothèse est accessible à l'expérience.

Pour savoir ce qu'il en était, de la levure commerciale a été mélangée avec une solution de sulfate de cuivre, filtrée et lavée jusqu'à disparition du cuivre dans les eaux de lavage. En calcinant la levure restante, on a toujours trouvé du cuivre dans le résidu. Il y a donc fixation de cuivre, mais quelles en sont les conditions? La quantité fixée varie-t-elle avec le temps du contact, avec la dilution de l'antiseptique, avec l'état de la levure? La fixation est-elle due uniquement au contenu soluble ou aux produits de la cellule, ou se fait-elle aussi sur son enveloppe?

Pour résoudre ces questions, il a fallu renoncer aux méthodes bactériologiques et recourir à l'analyse chimique. On faisait agir directement le sulfate de cuivre sur une quantité connue de levure du commerce en suspension dans l'eau; puis on filtrait. Une portion mesurée du liquide filtré servait à déterminer le cuivre. Connaissant ce qu'il y avait originairement de ce métal, on pouvait calculer ce qu'en contenait le liquide entier, et ce qu'il en restait pour la levure.

En chauffant la levure avec de l'eau à 100°, on la tue, on coagule son protoplasme, et on provoque l'exsudation du contenu soluble de la cellule. J'ai cherché tout d'abord les quantités de cuivre fixées comparativement par la levure ordinaire et la levure bouillie, dans des temps différents. Le cuivre était déterminé par précipitation avec le zinc, et, dans les expériences suivantes, la quantité de levure correspondante à la quantité de cuivre donnée comme fixée était de 0^{re},95 à 1 gramme, calculée à l'état sec. Le liquide contenait environ 1,43 0/0 de sulfate de cuivre cristallisé.

Temps de l'action.	Levure ordinaire.	Cuivre fixé.	Levure bouillie.	Cuivre fixé
A l'origine	0,188 gr. Cu	»	0,183 gr. Cu	»
15 minutes	0,179	0,009	—	—
1 heure	0,178	0,040	0,174	0,009
4 heures	0,1775	0,0105	0,1745	0,0085

La levure fixe donc environ 1 0/0 de son poids de cuivre. En réponse à la question si *tout* ce cuivre est fixé par les produits solubles, l'expérience répond non. En lavant la levure à l'eau bouillante jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus la

réaction des phosphates (qui comptent probablement parmi les produits solubles les plus adhérents à la cellule) en traitant le résidu par le sulfate de cuivre, filtrant à nouveau, et lavant jusqu'à disparition de ce métal dans les eaux de lavage, on a toujours trouvé du cuivre en quantités appréciables dans le résidu resté sur filtre. Évidemment les matériaux insolubles de la cellule prennent part à la fixation du cuivre observée dans ces expériences.

Mais la plus grande partie de l'effet est due aux matériaux solubles, et il était intéressant de savoir à quel état le cuivre était retenu par eux. Une portion du précipité produit dans l'eau de levure a donc été lavée jusqu'à disparition du cuivre soluble: en traitant le résidu par l'acide azotique dilué, on en a dissous une partie contenant tout le cuivre, et il en est resté une masse gélatineuse débarrassée de ce métal. En analysant dans deux portions égales du liquide filtré le cuivre et l'acide phosphorique, on a vu que ces deux corps étaient assez exactement dans les proportions correspondantes au second phosphate de cuivre $\text{Cu}^2\text{H}^2(\text{PO}^4)^2$.

	Trouvé.	Calculé.
Rapport $\frac{\text{P}^2\text{O}^5}{\text{Cu}}$	0,80	0,89

La plus grande partie du cuivre fixe était donc sans doute à l'état de phosphate insoluble de cuivre, et la question se pose de savoir si ce phosphate agit comme antiseptique quand il est introduit dans un liquide nutritif. En semant dans un tel liquide du *saccharomyces cerevisiae*, il n'y a pas eu de culture. Cela est sans doute dû à une solubilisation partielle du phosphate de cuivre par le phosphate acide de potassium certainement présent dans le liquide. En fait ce liquide s'est montré, après l'expérience, contenir des traces de cuivre en solution.

J'ai fait ensuite une nouvelle série d'essais quantitatifs dans lesquels, au lieu de séparer la levure par filtration, je me servais d'une machine centrifuge, ce qui supprimait diverses objections à la rigueur possibles contre la filtration. De plus le cuivre était déterminé par le titrage de l'iode mis en liberté par les sels de cuivre sur l'iodure de potassium. Voici le résumé de ces expériences. Dans chaque série la quantité de levure employée a été

la même, mais, en B, la solution de cuivre était plus forte qu'en A (comme on le voit dans la dernière colonne), et en C, la levure avait été préalablement chauffée avec de l'eau à 100°.

	Temps de l'action.	Cuivre fixé en mgr.			Quantité totale de cuivre à l'origine en A, B, C. ¹
		A	B	C.	
I	30 minutes	1,7	2,0	1,2	A = 21,2 mgr. B = 53 mgr. C = 20,6 mgr.
	7 h. 15	2,7	3,0	1,2	
II	30 minutes	3,3	4,0	—	A et C = 176 mgr. B = 88 mgr.
	7 h. 15 à 7 h. 30	—	6,0	3,3	

Ces expériences sur le sulfate de cuivre prouvent donc, je crois, qu'il y a une fixation du métal sur la levure, que la quantité fixée augmente légèrement avec le temps du contact ; que la levure bouillie en fixe pratiquement à peu près la même quantité que la levure non bouillie ; et que, dans ce cas, l'influence de la concentration est faible. On voit aussi que ce sont les produits solubles qui fixent la plus grande partie du cuivre : il y en a pourtant un peu fixé sur la substance de la cellule elle-même. Enfin cette fixation résulte, au moins pour la plus grande partie, de la formation d'un phosphate de cuivre insoluble que le liquide nutritif acide ou les sucs cellulaires acides peuvent ensuite solubiliser, lorsque l'atteinte portée à la cellule par sa formation n'est pas assez grande pour la tuer, et qu'elle peut commencer l'élimination de son toxique.

SELS DE FER, DE PLOMB ET DE MERCURE

Ces résultats obtenus avec le cuivre rendaient intéressante l'étude des sels métalliques doués d'une action analogue. J'ai étudié le sulfate de fer, l'acétate de plomb et de chlorure de mercure. Nous allons voir qu'il y a fixation dans tous les cas, mais que sa quantité ou ses conditions diffèrent.

L'action la plus voisine de celle du cuivre est peut-être celle du mercure. La quantité fixée est encore plus grande, comme l'indique le tableau suivant, composé comme celui qu'on a trouvé plus haut. On a séparé la levure par la machine centrifuge, et dosé le mercure par la méthode originale de Hannay (titrage avec le cyanure de potassium), soit avec la modification de Chapman-Jones (*Journal of the chem. Soc.*, 1892).

1. Les quantités de cuivre, de mercure, de fer et de plomb de ce tableau et des suivants sont celles qui contiennent 50 c. c. du liquide sur lequel on opérait.

	Temps de l'action.	Mercure fixé, en milligr.			Quantité totale de mercure à l'origine, en A, B, C.
		A	B	C	
I	45 minutes	27	40	28,5	A et C = 435 mgr
	24 heures	31,5	—	37	B = 405 »
II	45 minutes	52,5	—	55,5	A et C = 451,5 »
III	45 »	123	—	—	A = 496 »
	5 heures	128,5	278,5	—	B = 588 »

On voit que la quantité fixée est extrêmement grande: dans la dernière expérience, où elle est la plus forte, la quantité de levure employée contenait seulement 0gr,6 de matière sèche. Il est clair qu'il s'agit ici d'une fixation d'un métal très lourd sur la totalité de la matière albuminoïde, et non, comme plus haut, de la formation d'un sel insoluble aux dépens de l'un des éléments minéraux de la levure.

En arrivant aux sels de fer, nous allons trouver une importante différence. Jusqu'ici l'effet du chauffage de la levure à 400° n'a pas été grand. Il l'est au contraire beaucoup avec le sulfate de fer, sans doute à cause de l'insolubilité du phosphate $\text{FeH}^6(\text{PO}^4)^3$ formé aux dépens du phosphaté acide de potasse du contenu cellulaire. Voici les résultats de mes expériences.

	Temps de l'action.	Fer fixé, en milligrammes.			Quantité totale de fer à l'origine en A, B, C.
		A	B	C.	
I	4 h. 48' à 2 h.	6,9	—	26	A et C 29 mgr.
	22 à 24 h. 45'	8,2	—	26	
II	2 h. à 2 h. 45'	6,2	—	24,9	A et C 24,5 mgr.
	9 heures	8,9	—	22,3	

La séparation de la levure a été faite au moyen d'un filtre renversé, formé d'un tube de verre fermé par un papier à filtrer, et plongé dans le liquide, de sorte que la portion filtrée était prise dans la profondeur. On évite ainsi tout changement de composition du liquide dû aux effets de la capillarité. On a employé la machine centrifuge dans la série suivante, qui se rapporte aux effets de la concentration de la solution sur la quantité de métal fixé. On va voir que cet effet est considérable.

	Temps de l'action.	Fer fixé, en milligrammes			Quantité totale de fer à l'origine en A, B, C.
		A	B	C.	
I	22 à 24 heures	9,2	19,3	—	A = 13,2 mgr. — B = 66 mgr.
II	45 minutes	9,6	24,5	—	A = 10,9 mgr.
	18 à 18 h. 15'	9,9	27,1	—	B = 43,8 —

J'arrive maintenant au dernier des métaux étudiés, le plomb. Celui-ci agit évidemment comme précipitant des matières orga-

niques de la levure. Mes résultats, surtout dans les séries I, II, et III, sont seulement approximatifs, mais ils n'en sont pas moins intéressants quand on les compare aux précédents.

Le plomb a été employé à l'état d'acétate et dosé à l'état de chromate, suivant la méthode de Frésenius. Les nombres suivants ont été obtenus après séparation par la centrifuge.

	Temps de l'action.	Plomb fixé, en milligrammes			Quantité totale de plomb à l'origine en A, B, C.
		A	B	C.	
I	15 minutes	59	75,5	—	A = 198 mgr.
	26 h. 30'	—	85	—	B = 495 »
II	35 minutes	43	44	91,5	A et C = 198 »
	18 h. 45'	—	—	94,5	B = 495 »
III	30 minutes	41	49,5	79	A et C = 99 »
	20 heures	—	75,5	—	B = 379 »
IV	15 à 20 min.	38,8	48	—	A = 75,8 »
	19 h. 15' à 20 h.	—	70	82,5	B et C = 379 »

Ces nombres, dans leur ensemble, sont concordants et placent ce métal auprès du fer, dont il diffère en ce qu'il y en a beaucoup plus de fixé par la même quantité de levure.

Tels sont mes résultats. Les conclusions auxquelles ils me conduisent peuvent être brièvement résumées de la façon suivante :

1° Avec certains sels métalliques doués de propriétés antiseptiques, la quantité d'antiseptique nécessaire pour tuer la levure augmente avec la quantité de levure. Avec le phénol on n'a pu constater, avec certitude, aucun effet pareil;

2° Avec les sels de cuivre, de plomb, de fer, et de mercure, l'effet antiseptique est dû à la fixation du métal par la levure. La quantité fixée varie d'un métal à l'autre, et, pour chaque métal, avec le temps de l'action, la dilution de la solution et les conditions de la levure;

3° Cette fixation est due, au moins en partie, à la formation d'un phosphate insoluble. En même temps, le métal est fixé d'une façon intime sur la paroi cellulaire. Il peut aussi, en outre, amener la précipitation de certains matériaux organiques de la cellule.

J'adresse, en terminant, tous mes remerciements à M. Duclaux, qui m'a inspiré l'idée de ce travail, et a bien voulu en surveiller l'exécution et la publication. Je remercie aussi M. Fernbach, en qui j'ai toujours trouvé l'aide et les conseils dont j'ai eu besoin.

RECHERCHES SUR LE POUVOIR ANTISEPTIQUE

DE

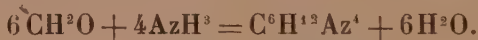
L'ALDÉHYDE FORMIQUE

PAR HENRI POTTEVIN

I

MÉTHODES DE DOSAGE

Les procédés jusqu'ici employés pour doser l'aldéhyde formique, ou formol, sont fondés sur sa transformation en aldéhydate d'ammoniaque suivant l'équation



O. Lœw (*J. f. prakt. Chemie*, t. XXXIII, p. 44) ajoute à la solution d'aldéhyde un excès de carbonate d'ammoniaque, évapore, dessèche à 100°, et pèse l'aldéhydate obtenu.

Trillat (*Comptes rendus*, 1893, p. 891) ajoute à l'aldéhyde de l'ammoniaque en excès; la portion qui n'entre pas en combinaison est chassée par un courant de vapeur d'eau, recueillie et dosée.

La décomposition très nette qu'éprouve à 100° l'aldéhydate d'ammoniaque en solution, et sa volatilité à l'état sec, rendent ces méthodes incertaines. On peut opérer avec plus de sûreté en utilisant les propriétés alcalines du corps $\text{C}^6\text{H}^{12}\text{Az}^4$, qui se comporte vis-à-vis des acides comme une base monoatomique, et dont la solution aqueuse, alcaline au méthylorange, est neutre à la phtaléine du phénol.

A la solution d'aldéhyde à titrer, on ajoute une quantité d'ammoniaque connue, telle qu'il en reste après combinaison un excès notable : on abandonne le mélange à la température ordinaire pendant 24 heures; la réaction étant alors terminée, on dose, à l'aide de la phénol-phtaléine, l'ammoniaque restée

libre; quand, par addition d'acide sulfurique, la coloration rouge a disparu, on ajoute du méthylorange, et on continue à verser de l'acide jusqu'à ce que la teinte passe au rouge franc : on évalue ainsi l'alcalinité totale du liquide.

Je me suis assuré que lorsqu'on sature par un acide un mélange d'ammoniaque et d'hexaméthylénamine : 1° c'est l'ammoniaque qui est saturée la première; 2° le dosage de l'alcalinité totale n'est pas influencé par la présence du sel ammoniacal résultant de cette saturation ¹.

Avec de beaux cristaux d'hexaméthylénamine purifiée par cristallisation dans l'alcool, je prépare une solution à 1/10 exactement. Je prépare d'autre part une solution d'ammoniaque à 5 0/0; des mélanges de ces deux solutions sont titrés au moyen d'acide sulfurique normal.

La dernière colonne du tableau ci-dessous contient les quantités d'acide sulfurique nécessaires pour la saturation, calculées d'après les poids d'ammoniaque et d'hexaméthylénamine.

Eau distillée.	Sol. Amm. 5 0/0.	Sol. Hexam. 1/10.	Acide à la phtal.	Acide au Méthylor.	Acide total calculé.
35	1	3	2.8	5.2	5.1
15	12	3	34.2	37.6	37.4
40	1	10	2.9	10.3	10.0
10	12	10	34.4	42.5	42.4
20	1	20	2.8	17.3	17.1
0	12	20	34.1	49.7	49.5

Quand on sature l'ammoniaque en présence de phénol-phtaléine, la décoloration est graduelle, et il est difficile de fixer le moment précis où elle devient complète; mais si on s'arrête quand le liquide conserve encore une teinte légèrement rosée, on est sûr que l'approximation est par défaut. D'un autre côté, la limite exacte de saturation de l'aldéhydate est difficile à préciser avec le méthylorange, mais on est sûr d'avoir une évaluation par excès si on va jusques au rouge franc. On peut ainsi évaluer par défaut l'ammoniaque non combinée, et par excès la quantité totale d'alcali présente dans la liqueur (ammoniaque et aldéhydate); de ces deux données on tire facilement deux valeurs de la quantité d'aldéhyde soumise à l'essai : elles sont approchées la première par excès, la seconde par défaut.

1. Peut-être n'en serait-il pas de même s'il y avait un grand excès d'ammoniaque donnant lieu à un grand excès de sel ammoniacal. J'ai vu, en effet, que la présence du chlorhydrate d'ammoniaque dans une solution d'ammoniaque, qu'on titre à la phtaléine avec HCl, accélère le virage. Mais il faut que le sel soit assez concentré.

Appelons A le volume de la solution titrée d'acide nécessaire pour saturer l'ammoniaque employée, diminué de celui qui correspond à l'acidité propre de la solution soumise à l'essai;

b le volume qui produit le virage à la phtaléine;

c le volume qui produit le virage au méthylorange;

p le poids d'ammoniaque saturé par l'unité du volume d'acide;

P le poids d'aldéhyde essayé;

Nous aurons :

$$P = p [A - b] \times \frac{45}{17}$$

$$P = p [A - c] \times \frac{60}{17}$$

Je donne ci-dessous, à titre d'exemple, les nombres obtenus en dosant une même quantité d'aldéhyde en présence de quantités croissantes d'eau distillée.

Sol. de dormol.	Eau distillée.	P. par excès.	P. par défaut.	Moyenne.
5 c. c.	0 c. c.	4 ^{sr} ,76	4 ^{sr} ,74	4 ^{sr} ,75
5 —	10 —	4 ^{sr} ,76	4 ^{sr} ,73	4 ^{sr} ,75
5 —	20 —	4 ^{sr} ,76	4 ^{sr} ,73	4 ^{sr} ,75
5 —	40 —	4 ^{sr} ,76	4 ^{sr} ,73	4 ^{sr} ,75
5 —	100 —	4 ^{sr} ,76	4 ^{sr} ,74	4 ^{sr} ,75

II

POUVOIR ANTISEPTIQUE

Il est bien établi aujourd'hui que, lorsqu'on fait l'étude d'un « antiseptique », il faut distinguer :

1^o Le pouvoir antiseptique proprement dit, mesuré par la grandeur des doses capables de préserver les infusions organiques putrescibles de l'envahissement par les infiniment petits;

2^o Le pouvoir bactéricide, mesuré par le temps de contact nécessaire pour tuer les germes microbiens, ou, pour mieux dire, pour les empêcher de se développer quand ils sont portés dans un nouveau milieu non additionné d'antiseptique.

Les deux pouvoirs ne vont pas nécessairement de pair. Au point de vue bactéricide, l'hypochlorite de chaux à 1/100 est

l'équivalent du sublimé acide à 1/100 : tous deux tuent, à la température ordinaire, les spores du *B. subtilis* en 15 minutes¹. Pourtant, pour empêcher la culture du *B. subtilis* dans le bouillon, il faut ajouter à celui-ci 1/300 d'hypochlorite², tandis qu'avec le sublimé 1/10000 suffit.

Les doses d'antiseptique nécessaire pour empêcher la pullulation dans un milieu nutritif des germes qui y sont semencés varie avec la nature de ces germes : d'une façon générale elle sera d'autant plus faible que le milieu sera moins approprié à leurs besoins ou qu'ils seront eux-mêmes moins vigoureux. La germination des spores est toujours arrêtée par des doses incapables d'entraver le développement du microbe adulte. Ce sont là des notions courantes sur lesquelles il n'y a pas lieu d'insister : il n'en est pas tout à fait de même pour l'influence que peut avoir la quantité des germes introduits. Plus large est l'ensemencement, plus il faut d'antiseptique.

EXPÉRIENCE 1. — Des tubes à essai contenant chacun 10 c. c. d'un même moût de bière sont divisés en trois séries : *a*, *b*, *c*, et reçoivent des doses régulièrement croissantes de formol. Dans chaque série, la teneur en aldéhyde du premier tube correspond à 69 milligrammes par litre; la différence entre deux tubes consécutifs correspond à 23 milligrammes par litre.

Une certaine quantité de levure, représentant la culture totale obtenue dans 10 c. c. de moût, est séparée du liquide où elle a poussé, lavée trois fois à l'eau stérile (chaque lavage se fait en mettant les cellules en suspension pendant un quart d'heure dans 20 c. c. d'eau stérile et séparant à la turbine), puis délayée dans 10 c. c. d'eau stérile. Onensemence :

1° Avec 10 gouttes du mélange ainsi obtenu, les tubes de la série *a*;

2° Avec une anse de platine du même liquide les tubes de la série *b*;

3° La série *c* et une autre série de 10 tubes témoins qui n'ont pas reçu d'antiseptique sontensemencées avec une anse de platine d'un liquide obtenu en délayant dans 10 c. c. d'eau stérile une anse de platine du liquide qui a servi pour l'ensemencement des séries précédentes.

Le tout est mis à l'étuve à 23°.

L'examen des tubes fait au bout d'un mois a montré :

1° Que tous les tubes témoins avaient une culture;

2° Que dans les autres séries il n'y avait pas culture dans les tubes renfermant des doses de formol égales ou supérieures à

69 milligrammes par litre pour la série <i>c</i> .			
110	—	—	<i>b</i> .
161	—	—	<i>a</i> .

1. CHAMBERLAND et FERNBACH, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII.

2. CHAMBERLAND et FERNBACH (*Loc. cit.*).

EXPÉRIENCE II. — Je prépare un milieu nutritif avec :

Eau	4,000
Lactose	30
Bouillon Liebig	2,5

Des tubes à essai contenant chacun 40 c. c. de ce liquide sont divisés en 20 séries. Les tubes de chaque série reçoivent des doses régulièrement croissantes de formol (la différence entre la teneur en aldéhyde de deux tubes consécutifs correspondant à 20 milligrammes par litre), puis sontensemencés avec des quantités égales de levure. J'ai employé la levure alcoolique du lactose décrite par M. Duclaux. Les cellules, séparées du liquide où elles avaient poussé, lavées à l'eau comme celles qui ont servi pour l'expérience I, ont été mises en suspension dans l'eau stérile (5 grammes de levure fraîche pour 60 c. c. d'eau). En partant du mélange ainsi obtenu j'ai fait des dilutions dont chacune a servi pour l'ensemencement d'une série.

Les tubesensemencés, fermés par des capuchons de caoutchouc, mis à l'étuve à 36°, ont été examinés au bout d'un mois.

Le tableau ci-dessous contient : 1° dans la colonne I, des nombres proportionnels à la quantité de levureensemencée; 4,000,000 correspond à 0^{es},20 de levure fraîche; 2° dans la colonne II, les nombres représentant en milligrammes par litre la teneur en aldéhyde du dernier tube où la levure a vécu. Pour les tubes très largementensemencés, où la semence aurait pu vivre sans pulluler d'une façon sensible, j'ai cherché si du lactose avait disparu.

I	II
—	—
2,000,000	300
1,000,000	200
250,000	140
100,000	140
10,000	140
2,500	120
1,000	120
250	120
100	80
75	120
50	60
25	80

De ces expériences, il ressort :

1° Que tant que la quantité de cellulesensemencées est petite, les doses d'antiseptique nécessaires pour empêcher la culture varient d'une façon irrégulière, dans des proportions notables; elles sont toujours inférieures à celles que nécessitent desensemencements plus larges; 2° à partir du moment où on a mis des germes en nombre suffisant, les irrégularités disparaissent et la

dose stérilisante reste fixe; elle s'élève à nouveau, d'une façon progressive, avec des ensemencements massifs.

Les irrégularités observées avec les ensemencements très faibles tiennent peut-être uniquement à ce que les cellules qui composent la culture-mère ayant chacune ses qualités spéciales et en particulier sa résistance propre vis-à-vis de l'antiseptique, il peut arriver, lorsqu'on en prend très peu, que tous les degrés de l'échelle de résistance ne soient pas représentés en chaque prise de semence. L'élévation de la dose stérilisante avec la quantité de semence provient d'une autre cause, d'ordre plus général.

Lorsqu'on met une quantité massive de levure en suspension dans un moût additionné de formol, celui-ci semble partiellement fixé par les globules; la teneur du liquide filtré en aldéhyde appréciable à la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux diminue, et cette diminution, très supérieure à celle qui résulterait de la dilution si on remplaçait la levure par un égal volume d'eau, est trop brusque pour qu'on doive penser à une combustion. Pour préciser ces notions par des nombres immédiatement applicables à l'interprétation des phénomènes que nous avons en vue, il faut abandonner le formol, trop volatil et trop instable, et s'adresser à un antiseptique tel que le sulfate de cuivre, qui se comporte comme le formol et se prête mieux aux recherches.

EXPÉRIENCE III. — Avec du sucre blanc commercial et du sulfate de cuivre cristallisé pur dissous dans l'eau distillée, je fais cinq solutions contenant pour 100 c. c. :

	Saccharose en gr.	SO ⁴ Cu en milligr.
I	5	349
II	5	428
III	5	64
IV	5	43
V	5	32

Avec chacune d'elles, je prépare une série de cinq ballons contenant :

	Solution cuivrique et sucrée en c. c.	Levure fraîche en grammes.
Ballon 1	400	40
— 2	400	8
— 3	400	6
— 4	400	4
— 5	400	2

La levure est une levure commerciale très pure; avant d'être utilisée, elle a été lavée à l'eau, comme il a été dit précédemment. Le tout est abandonné à la température de 23°. Au bout de quelques heures, une fermentation très active s'établit dans les ballons suivants :

Ballons à 10 grammes de levure, séries V, IV, III.			
—	8	—	séries V, IV.
—	6	—	série V.

Dans les autres, la levure reste inerte.

Après vingt-quatre heures de contact, je sépare à la turbine les cellules du liquide ambiant et je dose le cuivre restant dans celui-ci. Le tableau ci-dessous donne, exprimées en milligrammes, les quantités de SO_4Cu disparu, en supposant que tout le cuivre qui reste en solution est à l'état de sulfate.

Indication des ballons.	Indication des séries			
	I	II	III	V
1	105	77	53	32
2	?	66	47	27
3	65	51	37	23
4	39	32	27	22
5	20	16	13	12

Si nous comparons les résultats fournis par les ballons 1 de la série III et 4 de la série V, nous voyons que la quantité de cuivre disparu par gramme de levure introduite est à peu près la même dans les deux cas : la quantité qui reste dissoute à la fin de l'expérience est la même aussi; pourtant, dans le premier ballon, une fermentation tumultueuse s'est établie en quelques heures, tandis que dans le second on n'a observé, après 24 heures, aucun dégagement gazeux. Cela prouve que la diminution de la teneur en cuivre soluble ne peut, à elle seule, expliquer l'abaissement du pouvoir antiseptique. Tout le cuivre ne reste pas à l'état de sulfate, une partie entre en combinaison avec les matériaux solubles diffusés hors des cellules. On est prévenu qu'il en est ainsi par le changement de teinte de la solution cuivrique : après l'addition de la levure, la couleur bleu faible du sulfate est remplacée par une couleur bleu d'azur beaucoup plus intense.

Il est probable que des combinaisons nouvelles prennent naissance aux dépens du sulfate de cuivre et des phosphates de la levure, car lorsqu'on ajoute du sulfate de cuivre à de l'eau de

levure, on observe un changement de teinte analogue à celui dont j'ai parlé, et il se produit un précipité de phosphate de cuivre; d'autre part, les liquides de l'expérience IV sont riches en phosphate dissous.

EXPÉRIENCE IV. — Dans trois ballons contenant 100 c. c. d'une solution de saccharose à 5 0/0 et ayant reçu 0^{gr},5, 0^{gr},2, 0^{gr},1 de SO⁴Cu. je délaye 16 grammes de levure fraîche dont les cendres renferment 0^{gr},145 d'acide phosphorique. Après vingt-quatre heures de contact, je sépare les globules du liquide, je les lave à l'eau distillée sur un filtre à succion jusqu'à ce que les eaux de lavage ne renferment plus de cuivre : le liquide et les eaux de lavage sont évaporés, le résidu calciné, et, dans les cendres, je dose le cuivre et l'acide phosphorique; ce dernier est pesé à l'état de phosphate d'urane.

Poids de Cu prés. au début.	Poids de Cu restant dissous.	PO ⁴ H ³ en solution.
0 ^{gr} ,254	0 ^{gr} ,186	0,094
0 ^{gr} ,101	?	0,090
0 ^{gr} ,051	0 ^{gr} ,013	0,094

Les liquides contiennent aussi des quantités notables de matières albuminoïdes qui peuvent s'unir au sel métallique.

La diminution de la teneur en cuivre dissous peut être due, en partie, à une précipitation à l'état de phosphates insolubles accomplie tant à l'extérieur qu'à l'intérieur des globules; toutefois, l'examen microscopique des dépôts de levure ne m'a jamais révélé l'existence d'un précipité.

Dans l'expérience IV pour le ballon à 0^{gr},5 de sulfate, la quantité de cuivre disparu a été de 0^{gr},68. Pour précipiter ce cuivre à l'état de (PO⁴)²Cu³ il faudrait 0^{gr},071 d'acide phosphorique: or sur 0^{gr},145 qu'en contenait la levure 0^{gr},94 restent en solution, et le dépôt en renferme seulement 0^{gr},051; il est donc certain que tout le cuivre disparu n'est pas précipité à l'état de phosphate, et qu'une portion, qui varie avec les conditions de l'expérience, est fixée sur les globules par un mécanisme spécial.

Mais ces considérations sortent déjà du cadre de notre étude; la seule chose qu'il importe de retenir pour le moment, c'est que les antiseptiques n'exercent pas simplement des actions de présence après lesquelles leurs solutions conserveraient toutes leurs propriétés initiales. Ils s'unissent à la substance des microbes et sont immobilisés par elle. L'effet obtenu doit donc

dépendre des proportions d'antiseptique et de germes mis en présence.

L'expérience suivante vient encore à l'appui de ces conclusions et nous ramène à l'aldéhyde formique ¹.

EXPÉRIENCE V. — Quatre ballons contenant respectivement 10, 50, 100, 1,000 cent. cubes d'un liquide nutritif identique à celui de l'expérience III, additionné de formol à la dose de 0 gr, 240 par litre, reçoivent chacun la même quantité de levure fraîche (levure du lactose de Duclaux), puis, fermés par des capuchons de caoutchouc, ils sont mis à l'étuve à 35°; au bout de 15 jours, la levure était morte dans le ballon de 1 litre et le lactose était intact : dans les autres, il avait partiellement fermenté.

III

POUVOIR BACTÉRICIDE

Nous avons vu, au chapitre précédent, que la quantité de germes ensemencés avait une influence sur la dose d'antiseptique nécessaire pour empêcher la culture : elle influe de la même façon sur le temps au bout duquel ces germes sont tués.

EXPÉRIENCE VI. Une certaine quantité de levure de bière représentant la culture totale obtenue dans 20 c. c. d'un moût de concentration moyenne est recueillie, lavée, et mise en suspension dans 10 c. c. d'eau stérile, dilution I.

1. Bien des auteurs : Trillat, Aronson, Berlioz, ont déterminé les doses de formol nécessaires pour empêcher la culture dans le bouillon des divers microbes pathogènes. Les nombres auxquels ils sont arrivés ne diffèrent pas de ceux que j'ai obtenus moi-même. D'une façon générale on peut dire que pour tous les microbes étudiés (bactéridie charbonneuse, bac. de la diphtérie, bac. pyocyanique, bac. du choléra, bac. typhique, *B. coli*, staphylocoque doré) la dose infertile est voisine de 0 gr, 05 par litre.

H. Schild (*Zeitschrift für Hygiene*, mars 1894) a dit que le bacille d'Eberth et le *Bacterium coli* présentaient vis-à-vis de l'aldéhyde formique des résistances très différentes : les doses infertiles seraient d'après lui 1/13000 pour le premier : 1/4000 pour le second. Ces affirmations sont en contradiction absolue avec celles de M. Berlioz aussi bien qu'avec le résultat de mes propres recherches. J'ai étudié des bacilles typhiques récemment retirés de la rate, et divers *B. coli* tirés des selles. Dans les bouillons fortement antiseptisés, le *B. coli* pousse généralement plus vite que le *B. typhique*, mais jamais il ne s'est développé en présence de doses d'aldéhyde supérieures à 0,07/1000.

Dans la pratique, chaque antiseptique a ses indications spéciales : les sels métalliques ne doivent être employés ni dans les milieux alcalins ni dans les milieux fortement albumineux ; l'aldéhyde formique agit très bien dans ces conditions, et n'est à rejeter que pour la stérilisation des liquides ammoniacaux. En milieu alcalin ou neutre, l'aldéhydate d'ammoniaque a un pouvoir antiseptique

2 gouttes de la dilution I diluées en 10 c. c. d'eau stérile dil. II.
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> 2 II III. </div>

De chacune de ces dilutions je prends 5 c. c. qui sont mélangés à 5 c. c. d'une solution de formol à 2 0/00; toutes les 5 minutes, je prélève dans ces mélanges une goutte qui estensemencée dans 20 c. c. de moût de bière mis ensuite à 22°.

Avec les dilutions II et III, les ensemencements sont restés stériles dès la première prise; avec la dilution I, ils l'ont été seulement après 4 heures.

On voit que la même quantité de levure qui, semée dans 10 c. c., de liquide nutritif antiseptisé, a déterminé une fermentation très active, a été tuée quand on l'a mise en présence de 1 litre du même liquide.

Toutes les considérations que j'ai développées sur l'inégale résistance des germes qui composent une culture et sur les unions qu'ils peuvent contracter avec la substance antiseptique trouveraient leur place ici: je n'y reviendrai pas.

Le formol qui, lorsqu'il s'agit de stériliser un milieu de culture, est plus actif que le sublimé acide, lui est inférieur au point de vue de la rapidité d'action. D'une façon générale, on peut dire que les organismes sans spores, immergés, en petite quantité, dans la solution à 1 p. 1000 sont tués au bout d'un temps variable entre 15 minutes et quelques heures.

Pour me rapprocher autant que possible des conditions pratiques de la désinfection, j'ai surtout étudié l'action sur les germes desséchés sur des morceaux de toile.

Après avoir subi l'action de l'antiseptique, les germes et leur support étaient lavés pendant 1/2 heure dans l'eau stérile faiblement ammoniacale (1 gr. d' AzH_3 pour 10 litres d'eau), l'ensemencement d'épreuve était fait ensuite dans du bouillon de veau exactement neutralisé au tournesol et additionné de 1/10000 d'ammoniaque. Je me suis assuré qu'à cette dose l'ammoniaque ne retarde pas la germination des spores (*B. subtilis* et *B. anthracis*), et la favorise plutôt. Les ballons mis à l'étuve à 35° ont été examinés un mois après l'ensemencement quand il s'est agi du *B. subtilis*; pour le charbon, les morceaux de toile qui, après huit jours, n'avaient pas donné de culture, étaient repris et introduits avec pureté sous la peau d'un cobaye.

à peu près nul; à la dose de 2 0/0, il n'empêche pas le *B. coli* de pulluler dans le bouillon; en milieu acide, il devient beaucoup plus actif; 350 milligrammes par litre empêchent le développement de l'*aspergillus* dans le liquide Raulin.

Spores de subtilis immergées dans la solution de formol à 15°.

La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 30 heures.

—	15 0/0	—	11	elle a tué en 20 heures.
—	42 0/0	—	4	6 —

Spores charbonneuses immergées dans la solution de formol à différentes températures.

15° { La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 2 heures.
 — 15 0/0 — 1 heure, a tué en 1 heure 1/2.
 — 42 0/0 — 30 min. — 1 heure.

35° { La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 1 heure.
 — 15 0/0 — 15 min., elle a tué en 30 min.
 — 42 0/0 — 5 min. — 15 min.

52° { La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 5 min., elle a tué en 15 min.
 — 15 0/0 — — — 5'
 — 42 0/0 — — — 5'

Spores du B. subtilis exposées aux vapeurs émises par la solution de formol à différentes températures.

Dans des flacons à large goulot d'une capacité de 400 c. c. je mettais 50 c. c. de la solution à étudier, un petit disque de porcelaine percé de trous était suspendu au bouchon, à 3 c. c. environ au-dessus de la surface du liquide. Les flacons stérilisés à l'autoclave recevaient la solution d'aldéhyde, puis étaient placés dans un bain-marie à température constante, sauf pour les expériences à 15° qui se faisaient à la température du laboratoire; au bout de 2 heures, je disposais sur les disques flambés au préalable, les morceaux de toile, supportant les spores.

15° { La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 56 heures.
 — 15 0/0 — 56
 — 42 0/0 — 30 — a tué en 44 heures

35° { La solution à 2 0/0 n'a pas tué en 6 heures, elle a tué en 18 heures.
 — 15 0/0 — 2 — 6 —
 — 42 0/0 — — — 2 —

52° { La solution à 2 0/0 a tué en 2 heures.
 — 15 0/0 — 4 heure.
 — 42 0/0 — 1 —

Spores de subtilis exposées aux vapeurs émises par la poudre de trioxyméthylène sèche.

La marche des expériences et le dispositif des appareils sont les mêmes que ceux adoptés pour l'étude des vapeurs émises par les solutions : celles-ci sont remplacées par une certaine quantité de poudre de trioxyméthylène : les flacons ont été laissés 24 heures au bain-marie avant l'introduction des germes.

Pour tuer les spores sèches du *B. Subtilis*, il a fallu 3 jours à 52°; à 35° ce temps n'a pas suffi.

Les spores charbonneuses sèches ont été trouvées mortes après une exposition de 48 heures à 35°.

Les germes humides sont plus rapidement atteints que les germes secs. Si on prend les morceaux de toile qui ont servi aux expériences précédentes, au moment où ils viennent d'être souillés par la culture de *B. subtilis*, ou si, après qu'ils ont été desséchés, on les immerge pendant quelques heures dans l'eau stérile à la température ordinaire, on trouve qu'ils peuvent être stérilisés par une exposition aux vapeurs de trioxyméthylène de 24 heures à 35°.

Les expériences que je viens de rapporter prouvent que l'élévation de la température augmente considérablement le pouvoir bactéricide de l'aldéhyde formique. Si nous les rapprochons de celles de MM. Chamberland et Fernbach (*l. c.*), nous voyons que lorsqu'il s'agit de tuer des germes plongés dans l'antiseptique à la température ordinaire, le chlorure de chaux à 1/10 et le sublimé acide à 1/100 sont plus actifs que la solution à 42 0/0 de formol; à 52°, ils n'agissent pas plus vite que la solution à 2 0/0. Dès que la température dépasse 35°, les vapeurs de formol, même sèches, sont douées d'une énergie qui les rend précieuses pour la pratique de la désinfection.

IV

ACTION SUR LES DIASTASES

Présure. — L'aldéhyde formique ajouté au lait retarde sa coagulation par la présure.

Les nombres suivants se rapportent à des expériences faites avec une solution neutre de formol à 40°.

Temps de coagulation du lait témoin en min.	Formol en gr. p. litre	R ¹
—	—	—
45	4	2
27	0,8	1,7
27	1,6	∞
27	2,4	∞
65	0,8	1,8
65	5,2	très grand
65	4,6	∞

Si la quantité de présure augmente, les doses nécessaires pour empêcher la coagulation s'élèvent.

1. R. représente le rapport qui existe entre les temps de coagulation du lait témoin et du lait antiseptisé.

La présure maintenue au contact des solutions concentrées de formol, devient inactive.

Sucrase. — O. LÖEW (*Journal für praktische Chemie* (2), 37, p. 101) a étudié l'action du formol sur la sucrase, mais ses expériences sont viciées par une cause d'erreur inhérente au procédé par lequel il cherchait à apprécier la quantité de sucre interverti : il se contentait pour cela d'une lecture au polarimètre, or j'ai trouvé que l'aldéhyde formique, dont la solution n'a pas d'action sur la lumière polarisée, exagérât, dans le sens dextrogyre, le pouvoir rotatoire du saccharose.

EXPERIENCE : A des solutions contenant pour 100 c. c. 18^{gr},25 de saccharose, j'ajoute du formol aux doses suivantes :

Liquide	<i>a</i>	13,4	0/0
—	<i>b</i>	3,4	—
—	<i>c</i>	1,1	—

Le pouvoir rotatoire augmente brusquement d'abord, lentement ensuite, il atteint son maximum et demeure invariable après 3 heures pour le liquide *a*, après 1 heure pour les deux autres. Les valeurs auxquelles il arrive ainsi sont :

73°, 4	pour le liquide	<i>a</i>
69°, 1	—	<i>b</i>
68°, 4	—	<i>c</i>

Au lieu de 67°, 3, pouvoir rotatoire du saccharose.

La présence du formol modifie de même le pouvoir rotatoire de différents sucres : de l'acide tartrique, des tartrates. Je me borne pour le moment à signaler ces faits dont l'étude sera reprise.

Pour apprécier la quantité de sucre interverti, présent au sein d'une solution contenant du formol, j'ai transformé celui-ci en aldéhydate d'ammoniaque qui, je m'en suis assuré, ne réduit pas la liqueur de Fehling, puis j'ai dosé le sucre par réduction.

EXPERIENCE : Le liquide diastasifère a été obtenu au moyen de l'*Aspergillus Niger*, suivant la méthode indiquée par M. Duclaux, dans sa *Microbiologie*. L'interversion avait lieu à 54° en présence de 0,240 0/00 d'acide acétique. La solution sucrée était à 10 0/0. L'aldéhyde était emprunté à une solution neutre au tournesol.

Après 1 heure de séjour au bain-marie, les tubes à essai contenant les liqueurs en expérience recevaient une quantité de carbonate d'ammoniaque légèrement supérieure à celle qui était nécessaire pour neutraliser l'acide

acétique et transformer le formol en hexaméthylénamine, et étaient portés à l'ébullition pendant quelques minutes.

Formol en gr. p. 100 c. c.	Sucre int. en gr. p. 100 c. c.	R
0	3,3	—
0,1	2,9	1,1
1	2,3	1,4
5	1,4	2,4
0	1,2	
0,1	1,0	1,2
1	0,8	1,5
5	0,4	3.

Conservée au contact des solutions fortes d'aldéhyde, la diastase devient inactive au bout d'un temps d'autant plus long que la solution est moins concentrée.

La présence du formol ralentit aussi l'intervention du saccharose par les acides.

Les nombres suivants ont été obtenus en traitant à 54° une solution de saccharose à 10 0/0, par l'acide acétique à 4,6 0/0.

Formol en gr. p. 100 c. c.	Sucre int. en gr. p. 100 c. c.	R
0	1	—
1	0,8	1,2
5	0,5	2
14	0,36	2,8

J'ai observé des retards semblables quand j'ai produit des forces inversives du même ordre, en remplaçant l'acide acétique par l'acide sulfurique, l'acide oxalique, l'acide tartrique.

De ces faits, on est en droit de conclure que si l'aldéhyde formique a une action directe sur la substance diastasique, dont l'activité spécifique est amoindrie, puis supprimée, elle intervient en outre pour modifier l'état des corps sur lesquels agit la diastase, et rendre plus pénibles les transformations qu'elle doit accomplir.

V

ACTION SUR LES ANIMAUX

L'aldéhyde formique n'est pas très toxique d'après Aronson et Trillat : en injection sous-cutanée, elle ne tue pas le cobaye à la dose de 0^{gr},53 par kilogramme; en injection intraveineuse, une dose de 0^{gr},038 par kilogramme est sans action sur le lapin; ces nombres sont plus forts que ceux qui résultent de mes expé-

riences. Quand j'ai donné plus de 0^{re},25 par kilogramme sous la peau ou de 0^{re},03 par kilogramme dans les veines, les animaux sont presque toujours morts cachectiques au bout de quelques semaines. Dans ces cas, j'ai constaté la production constante de scléroses du tissu conjonctif sous-cutané, localisées surtout dans les régions inguinale et axillaire. Cette constatation, qui ne m'avait pas surpris quand l'aldéhyde était introduite sous la peau du ventre, m'a paru plus inattendue quand elle était injectée dans les veines de l'oreille. Lorsque j'ai essayé d'injecter, dans les veines de l'oreille d'un lapin, plus de 0^{re},04 de formol par kilogramme (j'employais une solution à 2 0/0), j'ai toujours déterminé la mort immédiate des animaux; à l'autopsie pratiquée aussitôt, je trouvais le sang coagulé dans toute l'étendue du système circulatoire (dans les poumons, dans les deux cœurs, dans l'aorte abdominale).

Des lapins pesant en moyenne 1,900 grammes ont pu, sans paraître souffrir de ce traitement, recevoir dans les veines, journellement pendant 4 jours, 2 c. c. d'une solution de formol à 2 0/0.

S'il est peu toxique, le formol est très irritant, et toutes les fois que j'ai injecté dans le tissu sous-cutané des solutions à 2, 1, 0,5 0/0, j'ai obtenu des nécroses de la peau qui se transformait en vastes escharres occupant parfois toute l'étendue de l'abdomen. Quand l'injection était faite dans les veines de l'oreille, celles-ci devenaient rouges, gonflées, et tous les tissus compris dans l'espace limité par le lacis des veines ainsi atteintes étaient nécrosés et tombaient.

Au cours d'essais de traitement de la teigne que j'ai rapporté ailleurs (*Société de Dermatologie*, 1894, p. 808), je me suis assuré que la solution à 2 0/0 était bien supportée par la peau, mais qu'il serait imprudent d'appliquer sur les téguments des solutions plus fortes.

Les vapeurs émises par les solutions concentrées et la poudre de trioxyméthylène sont très dangereuses à respirer. Un cobaye exposé pendant plusieurs heures dans un cristalliseur à double fond, incomplètement fermé, à la partie inférieure duquel on met une certaine quantité de formol à 42 0/0, meurt en quelques jours. Pour cette raison, l'aldéhyde formique ne devra être employée dans la pratique de la désinfection qu'avec une extrême prudence.

REVUES ET ANALYSES

SUR L'ALIMENTATION DES NOUVEAU-NÉS

REVUE CRITIQUE

Que faire quand la mère ne peut donner à son bébé que du lait de qualité médiocre ou en quantité insuffisante ? Voilà une question que les parents ont trop souvent à se poser, et qui peut recevoir bien des solutions. Il y a tout d'abord la nourrice, mais cette solution n'est pas seulement coûteuse ; elle a l'inconvénient plus grave de créer une lèpre sociale, qui fait naître des difformités partout où elle s'installe. Si on a détourné jusqu'ici ses regards de cette plaie, c'est qu'on la croyait inévitable ; une nourrice, même médiocre, semblait préférable au meilleur hiberon. Mais là-dessus, comme sur tant de points, les idées pastoriennes ont amené une révolution. En nous montrant que le lait est surtout dangereux par les microbes qu'il contient, elle nous ont donné la raison de la supériorité du lait de la nourrice, toujours *frais* au moment où il est absorbé ; mais elles nous ont permis aussi de préparer un lait stérile, dont l'introduction dans l'alimentation des nouveau-nés a été un véritable bienfait, ainsi qu'en témoignent tant de statistiques, parmi lesquelles il faut faire une place à part à celles du professeur Budin, publiées récemment dans les *la Revue des Sciences* de M. Olivier (1894).

Il est clair que ce lait alimentaire, stérile au moment où il sort du sein ou du flacon bouché qui le contient, ne reste pas longtemps à cet état. Il rencontre dans la bouche de l'enfant, dans son estomac, des microbes nombreux, et peut se peupler autant, au bout d'une heure ou deux de séjour, qu'un lait conservé comme à l'ordinaire 12 ou 24 heures dans une laiterie. Mais si la quantité des microbes est pareille, l'expérience apprend que la qualité n'est pas la même dans les deux cas. Ceux qui contaminent de préférence le lait dans la laiterie sont surtout des ferments lactiques dangereux pour l'estomac encore gélatineux de l'enfant, dangereux peut-être par l'acidité qu'ils y apportent, dangereux peut-être aussi (cette question mériterait

d'être élucidée) en ce qu'ils provoquent une rapide coagulation du lait aussitôt que celui-ci est arrivé dans l'estomac, et donnent à la caséine précipitée la forme de gros grumeaux difficiles à dissoudre. Les microbes qui tapissent la bouche, l'estomac, et le canal intestinal de l'enfant nourri au sein ou au lait stérilisé sont d'une toute autre nature. Ce sont des filaments fins, ne se décolorant pas par la méthode de Gram, et qui appartiennent à la tribu des *tyrothrix* aérobies, puissants producteurs de présure, dont j'ai autrefois décrit quelques espèces. Les selles ont une réaction très légèrement acide, une consistance d'onguent, et on n'y voit, au microscope, que des globules gras et des flocons amorphes de caséine, en dehors des éléments figurés provenant de l'épiderme ou des microbes du canal digestif.

Toutefois, ce n'est pas tout que d'assurer au bébé un lait aussi stérile que celui qu'il pourrait trouver au sein de sa mère ou de sa nourrice, il faut encore, autant que possible, assurer l'identité de composition.

Tout canal digestif a à la fois ses exigences et ses habitudes, mais lorsque, comme chez le nouveau-né, il est encore pour ainsi dire à l'état diffluent, il veut être infiniment respecté. Il est fait pour recevoir un aliment déterminé, contenant la matière grasse, la caséine, le sucre de lait, les sels minéraux dans des proportions déterminées, différentes de celles qu'exigerait le nouveau-né dans une autre espèce animale. C'est dire que, *a priori*, le lait de vache, de jument, ne convient pas plus à l'enfant qui vient de naître que le lait d'une jeune maman ne conviendrait à un veau. Le lait de vache, en particulier, contient plus de caséine et moins de sucre de lait que le lait de femme. Il est à peu près aussi riche en matière grasse. L'expérience apprend que l'enfant, tout jeune, ne peut pas le supporter : il faut l'étendre d'eau, de façon à amener sa caséine au même taux que dans le lait de femme. Le mode de coagulation dans l'estomac est alors à peu près le même qu'avec l'enfant nourri au sein : les flocons de caséine sont légers, gélatineux, franchissent facilement le pyllore pour aller se présenter à l'action digestive du pancréas, la digestion stomacale est brève, et l'enfant reste en appétit. Mais cette affusion d'eau n'en a pas moins des inconvénients. Si elle a l'avantage de ramener la caséine au même taux que dans le lait de femme, elle abaisse trop celui de la matière grasse qui doit rester voisin de 3 0/0, et aussi celui du sucre de lait, qui était déjà en déficit dans le lait de vache, et qui l'est encore plus après coupage. En moyenne, il tombe à 2,5 0/0, alors qu'il devrait se tenir au-dessus de 6 0/0.

Le problème n'avait pas de quoi embarrasser les hygiénistes. Il manque de la matière grasse et du sucre de lait, ont-ils dit; il suffit

d'en rajouter, et les propositions à cet effet n'ont pas manqué. On peut augmenter la proportion de matière grasse en ajoutant, au lait étendu d'eau, soit de la crème, fraîche ou conservée, soit du lait provenant des dernières portions de la traite, qui est, comme on sait, le plus riche en beurre. On peut de même, augmenter la proportion de sucre de lait en ajoutant soit du sucre de lait en nature, soit du petit lait, qui peut être considéré comme n'apportant que des sels minéraux et du sucre de lait. Mais tous ces mélanges avaient comme un vague parfum de pharmacie. Du lait qu'on étend d'eau, qu'on édulcore ensuite avec un sirop ou une façon de looch crémeux, a perdu son air d'innocence, et il ne faut pas s'étonner si ces pratiques ne se sont pas répandues, malgré le nom et l'autorité de ceux qui les recommandaient.

Peut-être un meilleur sort est-il réservé à une méthode récemment étudiée par M. le Dr Gaertner¹, et qui repose sur l'emploi de l'écrémeuse centrifuge. On sait quel est le principe de ses appareils. Imaginons un vase ventru, en forme de toupie tournant autour d'un axe vertical, et partagé par une cloison horizontale en deux compartiments l'un supérieur, l'autre inférieur, qui communiquent par une série d'ouvertures pratiquées sur tout le pourtour extérieur de la cloison horizontale. Faisons arriver du lait dans l'un de ces compartiments, l'inférieur par exemple. Le mouvement de la turbine va le coller le long des parois sur lesquelles il formera deux couches. La plus centrale, la plus voisine de l'axe contiendra le beurre, l'autre sera faite de lait écrémé et des matières lourdes contenues dans le lait, telles que cellules épithéliales, débris divers, poils et fragments de bouse de vache, microbes, etc. Cette couche collée le long des parois filera dans le compartiment supérieur par les ouvertures du pourtour, de sorte qu'en enfonçant dans les deux compartiments deux collecteurs ramassant le liquide qui en s'accumulant arrive à leur contact, nous pourrions trouver dans le compartiment inférieur du lait enrichi en crème, dans l'autre du lait écrémé. Si on étend de son volume d'eau le lait avant de l'introduire dans la turbine, et si on s'arrange pour puiser dans les deux compartiments des volumes égaux de liquide, il est clair que celui du compartiment inférieur comprendra la totalité ou la presque totalité de la matière grasse du lait primitif, et seulement la moitié de sa caséine ou de son sucre de lait. Ce n'est pas encore du lait de femme, puisqu'il y manque du sucre de lait, mais cela vaut mieux que du lait de vache étendu d'eau, puisque, par une simple opération mécanique, on en a augmenté et ramené à un niveau convenable la proportion de matière grasse.

Ce lait, essayé par M. Escherich, dont tout le monde reconnaît la

1. *Über die Herstellung der Fettmilch*, Vienne, 1894.

compétence, dans un service d'hôpital¹, a donné de bons résultats et semble destiné à se répandre. Il est vrai qu'il y a encore quelque chose d'artificiel dans la confection de cet aliment de la première enfance, mais tout est artifice quand la mère manque ou se refuse à son devoir, tout, jusques et y compris la nourrice.

E. DUCLAUX.

INSTITUT PASTEUR

Personnes mortes de rage pendant le traitement.

RICHAUD (Joseph), 4 ans; le père cultivateur à Beaussemlant (Drôme). Mordu le 4 octobre par un chien errant; le chien a été abattu le même jour et reconnu enragé par M. Belin, vétérinaire à Beaussemlant. L'enfant présente sur l'aile gauche du nez une morsure, et à l'avant-bras droit, face antérieure et face postérieure, tiers inférieur, 3 morsures; toutes ont bien saigné. Les plaies ont été cautérisées au nitrate d'argent 3 heures après. Richaud est traité du 7 au 27 octobre. Le 3 novembre l'enfant est pris de douleurs et de fourmillement dans le bras mordu, il a en même temps des spasmes laryngo-pharyngiens. Il succombe le 6 novembre dans la paralysie (observation du Dr Pangou de Saint-Vallier, Drôme).

BENTLEY (James), 18 ans, mineur, à Claytonle Moores, comté de Lancastre, Angleterre.

Mordu le 18 octobre par un chien errant, reconnu enragé par un vétérinaire, Bentley se présente le 23 octobre. Il porte à la main gauche 5 morsures sur les 2^e et 3^e phalanges du médius et de l'annulaire. Toutes ont bien saigné. Cautérisées au sublimé à 1 0/0 une demi-heure après. Le 8 novembre (18^e jour du traitement), Bentley est pris de rage; douleurs dans la main et le bras jusqu'à l'épaule, spasmes et étouffements (observation du Dr Roux). Transporté à l'hôpital Necker, il meurt le 10 novembre, à 6 heures du matin.

Cinq personnes, mordues par le même chien, sont encore en bonne santé.

Personnes mortes de rage après le traitement.

DESQUINCOURT (Julie), 43 ans, de Liévin (Pas-de-Calais).

Mordue le 16 février à la joue droite, au niveau du bord inférieur

1. Die Gartner'sche Fettmilch, Vienne, 1894.

de la cavité orbitaire. La morsure pénétrante avait bien saigné et n'avait pas été cautérisée. Le chien mordeur avait été déclaré enragé après autopsie par M. Parisse, vétérinaire à Lens.

M^{me} DESQUINCOURT, traitée à l'Institut Pasteur du 18 février au 10 mars, est morte de la rage le 12 juillet.

DELEPINE (Pierre), 15 ans, de Grostheil (Eure). Mordu le 16 juin, traité à l'Institut Pasteur du 17 juin au 7 juillet, mort de la rage le 12 août.

Le jeune DELEPINE avait reçu sur les deux mains et sur les avant-bras 34 morsures; toutes très pénétrantes, quelques-unes avaient été touchées au nitrate d'argent après une heure.

Un cobaye inoculé avec le bulbe du chien mordeur, le 18 juin, est mort de la rage le 24 août.

Quatre autres personnes mordues en même temps que Delepine sont actuellement en bonne santé.

STEVENSON Malcolm, 25 ans, officier au 93^e Highlander à Dalhousiey (Indes anglaises). Mordu le 10 juin, traité à l'Institut Pasteur du 1^{er} au 15 juillet, mort de la rage le 1^{er} août; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés vers le 28 juillet.

STEVENSON avait reçu à la main droite une morsure pénétrante, lavée à l'ammoniaque après 1 heure. L'animal mordeur, un chien errant, avait été abattu et examiné par le médecin du régiment qui avait prescrit l'envoi de Stevenson à l'Institut Pasteur.

VAYRE (Louis), 5 ans, de Bize (Aude).

Mordu le 29 juin, traité à l'Institut Pasteur du 8 au 25 juillet, mort de la rage le 1^{er} septembre.

Les morsures, au nombre de huit, toutes pénétrantes, siégeaient sur la périphérie de la jambe droite, elles avaient été faites sur le membre nu et n'avaient pas été cautérisées.

Le chien mordeur avait été reconnu enragé à l'autopsie par M. Maury, vétérinaire à Ginestas.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE.

JUILLET, AOUT ET SEPTEMBRE 1894.

	A		B		C				
Morsures à la tête { simples	»	1	2	»	8	17	»	2	5
et à la figure { multiples	»	1		»	9		»	3	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	4	»	»	»	4	»	»	2	»
Pas de cautérisation.	4	»	»	13	»	»	3	»	»
Morsures aux mains { simples	»	6	12	»	48	105	»	13	29
{ multiples	»	6		»	57		»	16	
Cautérisations efficaces	6	»	»	»	3	»	»	»	»
— inefficaces	6	»	»	»	34	»	14	»	»
Pas de cautérisation.	»	»	»	»	68	»	15	»	»
Morsures aux mem- { simples	»	1		»	23		»	13	47
bres et au tronc { multiples	»	6	7	»	58	81	»	34	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	4	»	»	»	40	»	33	»	»
Pas de cautérisation.	3	»	»	»	41	»	14	»	»
Habits déchirés.	5	»	»	»	57	»	38	»	»
Morsures à nu.	2	»	»	»	16	»	9	»	»
Morsures multiples en divers points du	»	»	»	»	3	3	»	»	»
corps.	»	»	»	»	»	»	»	3	3
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	»	»	1	»	2	»	»
Pas de cautérisation.	»	»	»	»	2	»	1	»	»
Habits déchirés.	»	»	»	»	1	»	2	»	»
Morsures à nu	»	»	»	»	2	»	1	»	»
<hr/>									
Totaux. { Français et Algériens. .	15	21	174	206	76	84			
{ Etrangers	6		32		8				
	A		B		C				
<hr/>									
TOTAL GÉNÉRAL 311									

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 292 fois ; chats, 19 fois.

Le Gérant : G. MASSON.